

Analize sadržaja aktivne komponente, onečišćenja u sirovini ili gotovom obliku i druge metode kemijske analize lijekova, za koje ne postoje ili se ne primjenjuju standardizirani analitički postupci, nužno podliježu zahtjevu za ispitivanjem prikladnosti analitičkih svojstava metode za danu primjenu. Stoga ih je potrebno podvrgnuti postupku kojeg nazivamo validacijom metode. Validacija metoda analize lijekova sastavni je dio dokumentacije za registraciju ljekovitih oblika ili farmakološki aktivnih tvari. Osnovni je element sustava osiguranja kvalitete i nužan preduvjet distribucije i terapijske primjene lijeka u Hrvatskoj i inozemstvu.

*“Validacija je potvrda ispitivanjem i prikupljanjem dobivenih objektivnih dokaza o ispunjavanju osobitih zahtjeva za predviđenu posebnu uporabu” (HRN EN ISO 8402 iz 1996.), odnosno to je postupak kojim se određuje i dokumentira prikladnost analitičkog sustava za određenu namjenu. Da bi se validirala analitička metoda, treba provesti vrednovanje svih njezinih bitnih koraka.*

Da bi se određena analitička metoda mogla nazvati validiranom i prihvatiti kao ispravna metoda analize određenog lijeka, ona mora zadovoljiti određene parametre koje je preporučila krovna svjetska organizacija za donošenje propisa u farmaceutskoj industriji, “International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use”, skraćeno ICH, sa sjedištem u Ženevi, a čije preporuke prihvaćaju i primjenjuju europska farmakopeja (European Department for the Quality of Medicines) sa sjedištem u Strasbourgu i američka farmakopeja (The United States Pharmacopoeial Convention) sa sjedištem u Rockvilleu.

Validaciju treba provoditi:

- pri uvođenju nove metode,
- prilikom prenamjene ili modifikacije postojeće metode,
- za utvrđivanje standardnog radnog postupka (standardne metode),
- za nenormirane metode,
- za metode razvijene u vlastitom laboratoriju,
- kada se normirana metoda želi primijeniti izvan normiranog područja,

– ako podatci kontrole kvalitete pokazuju da se rezultati dobiveni normiranom metodom s vremenom mijenjaju.

Cilj ovog rada bio je validirati metodu za određivanje sadržaja lidokaina u Lidokain spreju, tj. odrediti validacijske parametre: selektivnost, preciznost mjerenja, ponovljivost, intermedijarnu preciznost, linearnost, točnost, stabilnost mjernih otopina standarda i uzorka kod sobne temperature te otpornost. Određivalo se metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti uz UV detekciju (HPLC-UV) na Nucleosil C18 koloni, predloženoj za određivanje sadržaja lidokaina u Lidokain spreju.

## 2.1. Farmaceutici [1]

Lijekovi ili farmaceutici su tvari ili smjese različitih tvari koje u određenim količinama i pod određenim uvjetima služe za sprječavanje, ublažavanje, liječenje ili dijagnosticiranje bolesti ili bolesnih pojava u čovječjem ili životinjskom tijelu. Osnovna podjela lijekova je na prirodne, polusintetske i sintetske, odnosno na droge (biljnog, životinjskog i mineralnog podrijetla), na anorganske i organske kemijske preparate, galenske preparate te na serume i cjepiva.

Razlikujemo lijekove za unutrašnju i vanjsku upotrebu. Primjenjuju se ili lokalno (mazanjem na oboljeli dio kože, grgljanjem, ukapavanjem u oči, uho ili nos inhalacijom itd.), ili se uvode u organizam utrljavanjem kroz kožu (perkutano), uštrcavanjem pod kožu (supkutano), u mišić (intramuskularno) ili u venu (intravenozno), davanjem kroz usta (oralno), kroz crijevo (rektalno) itd.

Prema njihovoj svrsi, odnosno prema njihovom djelovanju razlikujemo:

- lijekove sa selektivnim djelovanjem protiv mikroorganizama (kemoterapeutici),
- sredstva za uklanjanje bolova (analgetici),
- za snižavanje temperature (antipiretici),
- za umirenje (sedativi i trankvilizanti),
- za pojačanje srčanog rada (kardiotonici),
- za snižavanje krvnog tlaka (antihipertenzivi),
- za liječenje neoplazmi (citostatici),
- za spavanje (hipnotici),
- za izazivanje neosjetljivosti (anestetici),
- za povraćanje (emetici) i čišćenje (purgativi),
- za iskašljavanje (ekspektorancije),
- za pospješivanje mokrenja (diuretici),
- za jačanje (tonici),
- za sprječavanje alergičnih simptoma (antihistaminici),
- za sprječavanje djelovanja otrova (antidoti) itd.

## 2.2. Anestetici [2]

Anestetici su sredstva koja uzrokuju neosjetljivost na mjestu primjene (lokalni anestetici) ili u čitavom tijelu (opći anestetici), tj. svojim djelovanjem na živčani sustav izazivaju anesteziju. Imaju minimalno štetno djelovanje na ostale organe, a nakon prestanka djelovanja, funkcija živčanog sustava se vraća u normalu.

Opća anestezija je postupno, povratno smanjivanje funkcija središnjeg živčanog sustava koje uzrokuje najprije gubitak svijesti, zatim neosjetljivost na bol (analgezija), gubitak sjećanja na operaciju (amnezija), i na kraju mišićnu relaksaciju. Postiže se davanjem jednog ili, puno češće, istovremenim davanjem različitih anestetika. Prema načinu unosa anestetika u tijelo opću anesteziju dijelimo:

- na inhalacijsku (anestetik u plinovitom obliku),
- na intravensku (iniciranjem anestetika u venu) i
- rektalnu (primjenom anestetika u debelo crijevo; koristi se rijetko, najčešće kod male djece).

Lokalna anestezija je postupak kojim izazivamo neosjetljivost na bol određenog dijela tijela, pri čemu je pacijent budan ili lagano uspavan. Mehanizam djelovanja lokalnih anestetika jest blokiranje putova impulsa tako što lokalni anestetici sprječavaju prolazak natrijevih iona kroz membranu živaca i time onemogućuju nastanak akcijskog potencijala. Smatra se da lokalni anestetici začepuju natrijeve kanale s unutrašnje strane membrane živaca. Lokalni anestetici su dušične baze i kao takve podložne su vezivanju slobodnih vodikovih iona (i prelasku u naelektrizirani amonijev ion). Ako je pH tkiva u koje se primijeni lokalni anestetik niži (na primjer pri upali na mjestu primjene), disocirat će sav primijenjeni lokalni anestetik, neće preostati nedisocirane slobodne baze i željeni učinak će izostati.

Osjetljivost pojedinih živčanih vlakana ovisi o njihovom promjeru i građi. Tako lokalni anestetik djeluje prije svega na senzorna živčana vlakna jer su ona najtanja. Svi osjeti ne

paraliziraju se istom brzinom. Prvo nestaje osjet boli, zatim osjet za toplo i hladno te, na kraju, dubinski osjet.

Prema mjestu i načinu primjene anestetika lokalnu anesteziju možemo podijeliti na:

- površinsku (na površinu tijela koja će biti operirana; anestetik se nalazi u obliku kapi, spreja ili masti; za manje zahvate u ustima, nosu ili na oku),
- infiltracijsku (iniciranje na mjestu i oko mjesta operacijskog zahvata; šivanje rane, odstranjivanje manjih kožnih i potkožnih promjena, operacija manjih preponskih kila, i sl.) i
- regionalnu (iniciranjem anestetika u blizinu živca ili leđne moždine izazivamo neosjetljivost na bol ili blokadu jedne veće regije na tijelu).

Prema kemijskome sastavu razlikujemo dvije vrste lokalnih anestetika: esterske i amidne (Tablica 1), a svojstva nekih od amidnih anestetika, u koje se ubraja i lidokain koji je tema ovog rada, prikazana su u tablici 2.

Tablica 1. Podjela anestetika

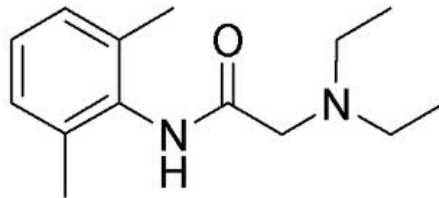
<b>Esterski lokalni anestetici</b>	<b>Amidni lokalni anestetici</b>
Kokain Benzokain Prokain Tetrakain ( <i>Gingicain, Potocain</i> ) Propoksikain ( <i>Ravocain</i> ) 2-Klorkain ( <i>Nesacain</i> )	Lidokain ( <i>Xylocaine, Otocaine, Xylestesin</i> ) Mepivakain ( <i>Carbocaine</i> ) Prilokain ( <i>Xylonest</i> ) Bupivakain ( <i>Marcaine, Anecaine</i> ) Artikain ( <i>Ultracaine</i> )

Tablica 2. Vrste anestetika i njihova svojstva

<b>Anestetik</b>	<b>Učinkovitost</b>	<b>Toksičnost</b>	<b>Brzina nastupa (min)</b>	<b>Trajanje (sati)</b>	<b>Doza (mg/kg)</b>
prokain	1	1	5-10	1	5-7
tetrakain	10	10	3-6	8	1-1,5
lidokain	4	2	2-4	1-2	3-7
mepivakain	4	2	2-3	1-2	7
bupivakain	16	8	2-3	8	4

### 2.3. Lidokain [3]

Lidokain (Slika 1) je lokalni anestetik amidskog tipa, ali i antiaritmik. Spada u I.b skupinu antiaritmika, tj. on je blokator natrijevih kanala. Njegovo dvojako djelovanje proizlazi baš iz činjenice da je svestrani blokator natrijevih kanala - blokadom natrijevih kanala na površini živaca on djeluje kao lokalni anestetik, a blokadom natrijevih kanala u srcu on se iskazuje kao antiaritmik. Hoće li lidokain djelovati kao lokalni anestetik ili kao antiaritmik - ovisi o načinu primjene. Primjerice, kada se lidokain daje lokalno, u tkivo ili pored živaca, pogotovo u kombinaciji s adrenalinom on djeluje kao lokalni anestetik. Međutim, ukoliko se primjeni intravenski tada djeluje kao antiaritmik.



Slika 1. Kemijska struktura lidokaina

Lidokain blokira natrijeve kanale, ali ta blokada traje kratko, tako da su mu učinci najizraženiji pri većim frekvencijama srca i u tkivu kojemu nedostaje kisika. Skraćuje akcijski potencijal i nije djelotvoran u liječenju aritmija atrijske. Ali, zato je vrlo učinkovit u zaustavljanju ventrikularnih aritmija (fibrilacije), pogotovo u stanjima kada treba hitno reagirati, kao što je infarkt srca i tijekom operacija na srcu. Također, daje se i nakon proživljenog infarkta srca radi prevencije ventrikularne fibrilacije.

Njegova je najčešća primjena kao anestetika u stomatologiji. Stabilan je i može se sterilizirati te ima veliku prodornu snagu. Djelovanje mu nastupa nakon 2 do 4 minute od primjene i traje 1 do 2 sata. Primjenjuje se za površinsku anesteziju u obliku spreja, gela i masti u 4%-tnoj koncentraciji. Kao antiaritmik koristi se u obliku injekcija, sam ili u kombinaciji s adrenalinom (Tablica 2).

## 2.4. Kromatografija [4]

Kromatografija je ime za skup fizikalno-kemijskih metoda za analitičko i preparativno razdvajanje sastojaka iz smjese. Tehnika separacije temelji se na odjeljivanju sastojaka neke smjese između pokretne i nepokretne faze. Pokretna (mobilna) faza, prelazeći preko nepokretne (stacionarne) faze, prenosi otopljene tvari, koje se po nepokretnoj fazi kreću različitim brzinama. Nepokretna faza mora se odabrati tako da zadržavanje molekula u njoj bude selektivno, tj. da različiti sastojci smjese budu uz nju različito dugo vezani, što uzrokuje razdvajanje smjese. Kao nepokretna faza služe aluminijev oksid, silikagel, dijatomejska zemlja, škrob, celuloza, različiti ionski izmjenjivači i dr., a kao pokretna faza većinom se primjenjuju organska otapala.

Kromatografske se metode dijele na više načina s obzirom na pojedina svojstva. Uobičajene su tri podjele - prema agregatnom stanju pokretne faze, prema načinu izvedbe i prema fizikalno-kemijskim procesima. Glavna podjela je prema načinu izvedbe, i to na plošnu kromatografiju i kromatografiju na stupcu (kolonska kromatografija).

Tablica 3. Podjela kromatografija

<b>KROMATOGRFIJA</b>	
<b>Kolonska kromatografija</b>	<b>Plošna kromatografija</b>
Tekućinska kromatografija	Tankoslojna kromatografija
Plinska kromatografija	Papirna kromatografija
Kromatografija sa superkritičnim fluidom	Elektrokromatografija

Plošna kromatografija je kromatografska tehnika u kojoj je nepokretna faza kromatografski papir ili sloj sorbensa nanesen na čvrst nosač, a pokretna faza prolazi kroz nepokretnu fazu pod utjecajem kapilarnih sila ili gravitacije. Kod kromatografije u koloni nepokretna faza ispunjava usku cijev kroz koju se pokretna faza kreće pod utjecajem tlaka ili rjeđe gravitacije.

## 2.5. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) [5]

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) je tehnika koja je zastupljena u analitičkim laboratorijima gotovo svih znanstvenih i gospodarskih grana. Uspješno se primjenjuje za odjeljivanje i kvalitativno i kvantitativno određivanje različitih organskih spojeva u kapljevitoj fazi. Njezine izvanredne separacijske sposobnosti, svestranost, tehnološka unaprijeđenost čine je rado korištenom u razvojno-istraživačkim i kontrolno-analitičkim laboratorijima, uključujući i laboratorije visokoreguliranih djelatnosti.

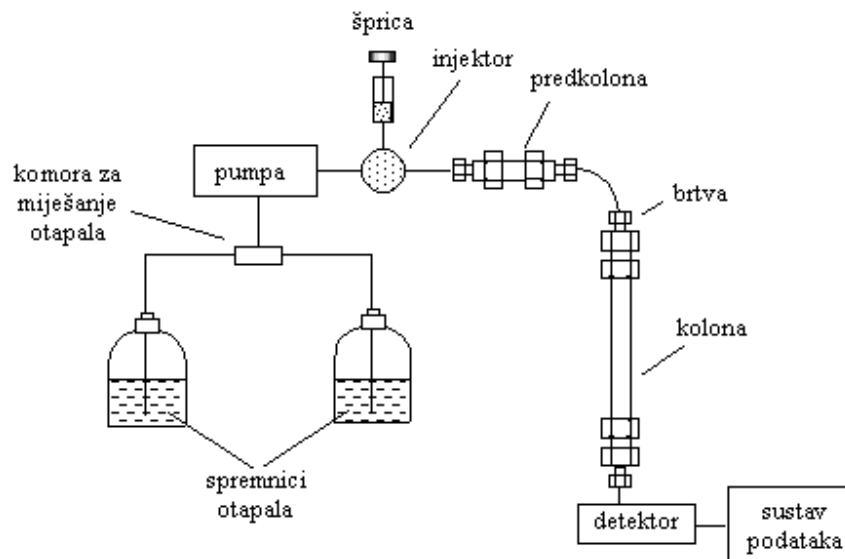
U tekućinskoj kromatografiji pokretna faza je kapljevina, a nepokretnu fazu mogu činiti različiti sorbensi pa tako imamo adsorpcijsku kromatografiju gdje je nepokretna faza adsorbens i razdjelnu kromatografiju pri kojoj je kapljevinska nepokretna faza nanosena na čvrsti inertni nosač.

Za razliku od klasičnih kromatografskih metoda, ima brojne prednosti:

- mali promjer čestica punila,
- kontrolirani protok pokretne faze,
- mali promjer kolone i mogućnost višekratnog korištenja kolone (punila),
- precizno injektiranje malih volumena uzorka,
- osjetljivi detektori za detekciju malih količina analita,
- automatizirani standardizirani instrumenti,
- visoki stupanj razdvajanja,
- brza analiza.

HPLC sustav (Slika 2) sastoji se od komore za miješanje otapala, pumpe i otplinjača (degazera), sustava za unošenje uzorka, kolone, detektora, te sustava za obradu podataka. U komori za miješanje otapala umješavaju se otapala za pokretnu fazu. Koriste se uobičajena otapala, čista ili u kombinaciji (npr. voda, metanol, organska otapala). Voda može sadržavati i neki pufer, kako bi se poboljšalo razdvajanje. Sastav pokretne faze može biti stalan tokom cijele analize, izokratičan, a moguće je koristiti i gradijentno eluiranje, što podrazumijeva promjenu sastava pokretne faze u toku eluiranja.





Slika 2. Shematski prikaz HPLC sustava

Pumpe visokog pritiska u takvim sustavima moraju zadovoljavati vrlo stroge uvjete: tlakove do 40 milijuna Pa, izlaz bez pulsiranja tlaka, širok raspon brzina protoka, ponovljivost protoka od 99,5% ili više te otpornost na koroziju izazvanu različitim otapalima. Otplinjač (degazer) uklanja zaostale plinove koji bi zbog stvaranja mjehurića mogli prouzročiti širenje zona eluiranih sastojaka i ometati rad detektora.

Sustav za unošenje uzoraka omogućava unošenje različitih volumena uzoraka u pokretnu fazu. Zovu se i automatski uzorkivači<sup>1</sup> pojednostavljuju rukovanje sustavom i smanjuju mogućnost pogreške kao posljedice ručnog iniciranja. Omogućuju kontinuiran rad sustava i u slučaju analize uzoraka velikih serija.

Kolona je srce kromatografskog sustava jer se upravo u njoj odvija sam proces kromatografije. Separacija uzoraka je tim učinkovitija što kolona ima više efektivnih tavana, a broj tavana se povećava smanjenjem veličine čestica samog punila. Kolona je obložena čeličnom cijevi unutarnjeg promjera od 2 do 8 mm i dužine od 30 do 300 mm. Cijeli sustav se može i grijati da bi se poboljšala učinkovitost separacije, ali rijetko na temperaturu višu od 60 °C zbog moguće razgradnje nepokretne faze ili hlapljivosti

<sup>1</sup> engl. autosampler

pokretne faze. Moguće je i postavljanje pretkolone za zaštitu analitičke kolone od zagađenja nečistim uzorcima. Punila ili sorbensi se s obzirom na kemijsku strukturu i polarnost dijele na:

- polarne anorganske sorbense (hidrofilni silikagel,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Mg-silikat),
- nepolarne anorganske sorbense (aktivni ugljen i grafit),
- polarne vezane faze (aminopropil, cijanopropil, diol),
- nepolarne vezane faze (alkani,  $\text{C}_8$  i  $\text{C}_{18}$  ugljikovodici),
- polarne organske sorbense (celuloza, poliamid, hitin).

Izbor nepokretne faze ovisi o prirodi ispitivanog spoja, prirodi ravnoteže kromatografskog procesa i vrsti veze koja nastaje između ispitivanog spoja i kromatografske podloge. Najčešće upotrebljavana nepokretna faza je silikagel,  $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , i može se upotrijebiti za gotovo sva odjeljivanja zahvaljujući velikom kapacitetu za uzorak i velikom broju primjenjivih oblika.

Detektor mjeri promjenu određene fizikalne veličine koju uzrokuje prolaz ispitivane tvari kroz mjerno-protočnu ćeliju detektora. Postoji više tipova detektora:

- spektrofotometrijski detektori (UV-VIS uz  $\text{DAD}^2$  ili  $\text{PDA}^3$ ), koji mjere apsorpciju zračenja kod određene valne duljine ili širokog spektra valnih duljina što rezultira karakterističnim signalom u kromatogramu. Najviše su u upotrebi zbog svoje jednostavnosti;

- refrakcijski detektori (RI), koji mjere razliku indeksa loma otopine s analitom i slijepe probe;
- fluorescentni detektori (FLD), koriste se kod određivanja spojeva koji fluoresciraju;
- elektrokemijski detektori – temelje se na mjerenju struje koja nastaje reakcijom oksidacije/redukcije analita na odgovarajućim elektrodama, a količina struje koja prolazi je direktno proporcionalna koncentraciji analita što omogućuje kvantitativno određivanje spojeva;

---

<sup>2</sup> **engl.** *Diode Array Detector (DAD)*

<sup>3</sup> **engl.** *Photo Diode Array (PDA)*

- konduktometrijski detektori - mjere kontinuirano vodljivost eluensa koji prolazi kroz kolonu, te prilikom pojave analita u protočnoj ćeliji dolazi do promjene vodljivosti eluensa;

- maseni (MS) - temelji se na ionizaciji atoma ili molekula te njihovom sortiranju i dokazivanju prema omjeru njihove mase i naboja ( $m/z$ ).

Bitni parametri koje mora zadovoljavati jedan detektor:

- mali pomak i šum kod snimanja bazne linije,
- visoka osjetljivost,
- brzi odziv,
- široko linearno dinamičko područje rada,
- mali „mrtvi“ volumen,
- dizajn protočnih ćelija detektora koje će sprječavati miješanje separiranih analita,
- neosjetljivost na promjenu vrste otapala, protoka i temperature,
- jednostavno i pouzdano rukovanje,
- podesivi tako da se mogu optimirati za različite spojeve,
- nedestruktivni prema uzorku.

## 2.6. Osnovni kromatografski pojmovi i definicije [6]

U ovom poglavlju istaknuti su bitni kromatografski pojmovi i definicije karakteristični za kromatografiju na stupcu, a kao rezultat kromatografske separacije dobiva se kromatogram prikazan na slici 3 s označenim osnovnim kvalitativnim i kvantitativnim parametrima kromatograma.

**Kromatogram** je grafički prikaz odnosa odziva detektora, koncentracije analita u eluatu ili druge veličine koja se koristi kao mjera koncentracije eluata prema volumenu eluata ili vremenu.

**Osnovna linija**<sup>4</sup> je dio kromatograma koji bilježi odziv detektora kada samo pokretna faza izlazi iz kolone.

---

<sup>4</sup> engl. *baseline*

**Kromatografska krivulja – pik** je dio kromatograma koji bilježi odziv detektora pri ispiranju (eluiranju) sastojaka s kolone.

**Zadržano vrijeme ( $t_M$ )** je vrijeme koje je potrebno za ispiranje sastojaka čija je koncentracija u nepokretnoj fazi zanemariva u usporedbi s njegovom koncentracijom u pokretnoj fazi, tj. nepokretna faza uopće ne zadržava taj sastojak.

**Vrijeme zadržavanja ( $t_R$ )** je vrijeme proteklo od početka ispiranja uzorka do maksimuma pika sastojka koji se određuje.

**Širina kromatografske krivulje ( $w$ )** je vrijeme zadržavanja paralelno s osnovicom. Ako osnovica nije paralelna s osi koja predstavlja vrijeme, tada se širina krivulje crta paralelno s tom osi.

**Faktor zadržavanja ( $k$ )** je omjer vremena koje sastojak uzorka provede u nepokretnoj fazi i vremena koje provede u pokretnoj fazi. On izražava koliko duže sastojak putuje kroz kolonu zbog zadržavanja u nepokretnoj fazi nego što bi putovao brzinom pokretne faze.

**Faktor razdvajanja ( $\alpha$ )** je vrijednost relativnog zadržavanja izračunatog za dvije susjedne kromatografske krivulje.

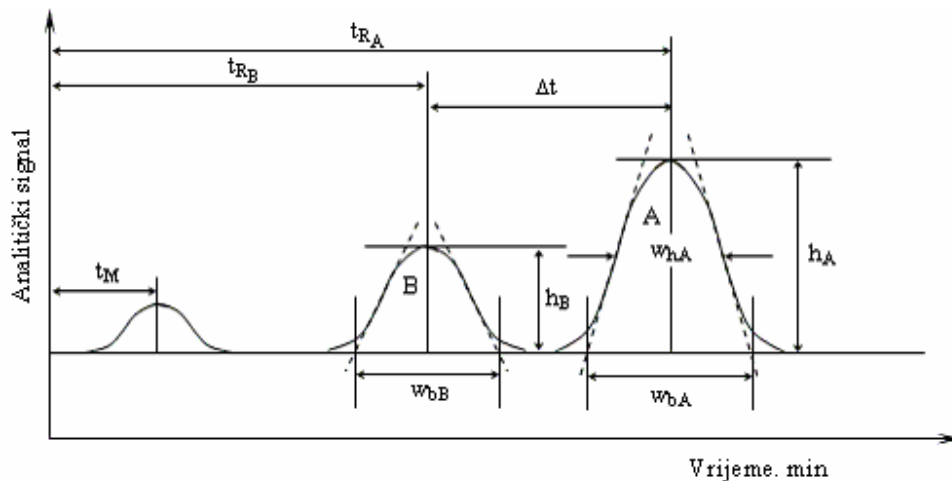
**Teorijski tavan** je područje u kromatografskom sustavu gdje se uspostavlja ravnoteža raspodjele komponente između nepokretne i pokretne faze. Kromatografski sustav se može zamisliti kao niz takvih područja. Kvaliteta razdvajanja sastojaka na koloni ovisi o učestalosti uspostavljanja ravnotežne raspodjele između pokretne i nepokretne faze, dok pokretna faza nosi sastojak kroz kolonu. S obzirom da u realnom kromatografskom sustavu nema odijeljenih područja gdje bi se uspostavljala ravnoteža, teorijski tavan je hipotetska veličina.

**Broj tavana ( $N$ )** je broj uspostavljenih ravnoteža između pokretne i nepokretne faze. Taj broj je korisna veličina za karakteriziranje kromatografskog procesa. Separacija uzoraka je tim učinkovitija što kolona ima više efektivnih tavana, a broj tavana se povećava smanjenjem veličine čestica samog punila.

**Visina ekvivalentna teorijskom tavanu ( $H$ )** predstavlja omjer duljine kolone i broja tavana. To je dužina malog segmenta kolone u kojem se uspostavljaju ravnotežni uvjeti tijekom prolaska uzorka kroz kolonu. Izražava se u milimetrima ili centimetrima.

**Broj efektivnih tavana ( $N_{ef}$ )** je broj koji označava djelotvornost kolone, a izračunava se pomoću prilagođenih vremena zadržavanja.

**Razlučivanje kromatografskih krivulja – pikova ( $R_s$ )** predstavlja mjeru djelotvornosti separacije dviju kromatografskih krivulja (pikova).



Slika 3. Osnovni kvalitativni i kvantitativni parametri kromatograma,  $t_M$  je zadržano vrijeme pokretne faze,  $t_{RA}$  i  $t_{RB}$  su ukupna vremena zadržavanja tvari A i B,  $\Delta t$  je razlika vremena zadržavanja,  $w_{bA}$  i  $w_{bB}$  širine pikova na baznoj liniji,  $w_h$  širina pika na polovici visine pika ( $h$ )

Na slici 3 prikazani su osnovni kvalitativni i kvantitativni parametri tipičnog HPLC kromatograma.  $t_M$  je zadržano vrijeme pokretne faze, tj. vrijeme potrebno da molekule pokretne faze prođu kroz kolonu. Također, to je vrijeme zadržavanja nezadržanog spoja, tj. spoja koji se uopće ne zadržava na nepokretnoj fazi. Obično ga se opisuje kao "mrtvo vrijeme" koje ustvari uključuje ukupno vrijeme od momenta injektiranja do momenta pojave molekula otapala.  $t_{RA}$  i  $t_{RB}$  su ukupna vremena zadržavanja tvari A i B,  $w_{bA}$  i  $w_{bB}$  širine pikova na baznoj liniji,  $w_h$  širina pika na polovici visine pika ( $h$ ). Idealan oblik kromatografskog pika odgovara normalnoj raspodjeli slučajne pogreške (Gaussova raspodjela), ali u realnoj kromatografiji pikovi često imaju izgled ne-Gaussove raspodjele.

## 2.7. Kontrola kvalitete [7]

Kontrola kvalitete obuhvaća sustav aktivnosti koji proizvođaču i/ili korisniku osiguravaju uslugu ili proizvod zadovoljavajuće, primjerene, ekonomične i pouzdane kvalitete uvjetovane definiranim normama. Glavne pretpostavke kontrole kvalitete su:

- odgovornost i educiranost osoblja, čime se ono upoznaje s važnošću svog posla i potrebom profesionalne odgovornosti za njegovo obavljanje,

- odgovarajuća opremljenost laboratorija, posebice kad je riječ o uređajima i opremi kojima se mora adekvatno rukovati i koji se moraju kontinuirano i primjereno održavati,

- dobra analitička praksa (*DAP*), stječe se iskustvom za svaki laboratorij, a uključuje dobru laboratorijsku praksu (*DLP*), koja propisuje postupke rukovanja kemikalijama, pranja posuđa, laboratorijskog reda i sl., te dobru mjeriteljsku praksu (*DMP*), koja daje smjernice i propise za provedbu mjerne tehnike koja se rabi u laboratoriju,

- standardni radni postupci (*SRP*), koji opisuju provedbu temeljnih operacija ili metoda koje provodi laboratorij, bilo da je riječ o uzorkovanju, pripravi uzorka, separaciji, mjerenju, bilo o baratanju podacima,

- validacija, dokumentirani proces određivanja pogodnosti mjernog sustava za dobivanje korisnih analitičkih podataka. Njome se dokazuje da je mjerni postupak prikladan za namijenjenu svrhu,

- obuka i uvježbavanje,

- inspekcija,

- sigurnost laboratorijskog rada, bez čega nitko ne bi smio početi raditi u laboratoriju,

- dokumentacija, važan dio svakog mjernog programa, mora sadržavati sve aspekte sustava osiguravanja kvalitete: model, plan, uzorkovanje, metodologiju, kalibraciju i podatke.

## 2.8. Validacija analitičkih metoda [8]

Svrha analize je dati pouzdanu informaciju o prirodi i sastavu materijala. U svako mjerenje uključena je mjerna nesigurnost, a namjena je programa osiguravanja kvalitete svesti te pogreške na prihvatljiv minimum što se, između ostalog, postiže validacijom uz prethodnu optimizaciju mjernog postupka.

Validaciju analitičkih metoda možemo definirati kao postupak kojim se osiguravaju točni, precizni i ponovljivi rezultati tijekom dugoročnoga korištenja metode. Također, validacijom se mogu utvrditi uzroci mogućih problema tijekom izvođenja metode, čime se postiže veliki stupanj pouzdanosti i pogodnosti metode.

S obzirom na svrhu primjene analitičkih metoda koje je potrebno validirati, a s ciljem definiranja validacijskih parametara koji će se primjenjivati tijekom validacije, analitičke metode se mogu podijeliti u četiri osnovne grupe:

1. Identifikacijski testovi,
2. Kvantitativni testovi određivanja sadržaja onečišćenja,
3. Limit testovi za kontrolu onečišćenja,
4. Kvantitativni testovi određivanja sadržaja analita u uzorku.

Svrha identifikacijskih testova jest potvrda prisutnosti nekog analita u uzorku. Prisutnost onečišćenja u uzorcima može se određivati limit testovima ili pak nekim od kvantitativnih testova. Pod kvantitativnim testovima koji se koriste za određivanje sadržaja analita u uzorku podrazumijevaju se metode određivanja sadržaja i ujednačenosti sadržaja aktivnih komponenata, metode oslobađanja aktivnih komponenata, metode određivanja sadržaja konzervansa, metode određivanja sadržaja ostatnih otapala i sl.

Validacija mora u sebi sadržati sve bitne podatke o analitičkom procesu određivanja. Uzima u obzir sve čimbenike koji utječu na rezultat koje laboratorij mora proučiti te ukloniti ili barem smanjiti učinak značajnih čimbenika i kasnije uspostaviti sustav nadzora.

Osnovni validacijski parametri ili izvedbene značajke koje se provode tijekom validacije analitičke metode su selektivnost, točnost, preciznost, stabilnost analita i standardnih otopina, granica detekcije, granica kvantifikacije, linearnost, radno područje i otpornost metode.

## 2.9. Osnovni parametri validacije [8]

### Selektivnost metode

Selektivnost, odnosno specifičnost metode, pri čemu se pod specifičnošću misli na mogućnost nedvosmislenog određivanja analita u prisutnosti drugih sastojaka uzorka, a pod selektivnošću sposobnost određivanja skupine sličnih sastojaka uzorka. Pri instrumentalnom određivanju specifična metoda daje signal koji odgovara samo odzivu analita, a selektivna je ona metoda kojom različiti sastojci smjese daju zasebne signale i međusobno ne utječu na rezultat.

Način prikazivanja rezultata ovisi o karakteristikama metode koja se koristi u navedenu svrhu. Kod spektrofotometrijske metode mjere se apsorbancije i snimaju spektri otopine uzorka, otopine smjese svih komponenata osim analita (*placebo*) i otopine standarda u određenom području. Kod primjene HPLC metode prikazuju se reprezentativni kromatogrami otopine uzorka, otopine standarda, otopina raznih onečišćenja, diluenta, pokretne faze i sl. Kod titrimetrijskih metoda prikazuje se utrošak titranta pri titraciji slijepe probe, otopine uzorka i otopine *placeba*.

### Točnost metode

To je razlika odnosno stupanj podudaranja između mjerene i prave vrijednosti uzrokovana uglavnom sustavnom pogreškom. Određuje se na minimalno tri koncentracijske točke unutar radnog područja. Ako metoda mora biti točna za šire koncentracijsko područje (npr. kod metode oslobađanja aktivne komponente), tada se točnost metode provjerava i na većem broju koncentracijskih točaka. Rezultat kojim se procjenjuje točnost metode izražava se kao postotak iskoristivosti<sup>5</sup>, odnosno povrat.

---

<sup>5</sup> engl. *recovery*



### **Preciznost metode**

Preciznost metode definiramo kao izraz slaganja između niza mjerenja provedenih iz istog homogenog uzorka prema propisanom analitičkom propisu. Uključuje dva pojma: ponovljivost rezultata koji su dobiveni istom metodom, istim uzorkom i u istim uvjetima te obnovljivost kad je riječ o istoj metodi i uzorku, ali su promijenjeni uvjeti izvedbe (mjesto, vrijeme, analitičar). Ako se postupak ponovi nekoliko puta unutar istog dana, tada govorimo o dnevnoj preciznosti ili preciznosti unutar dana, odnosno ako se postupak ponavlja nekoliko dana uzastopno tada govorimo o međudnevnoj preciznosti. Granice prihvatljivosti se definiraju ovisno o vrsti analize, prirodi uzorka te koncentraciji analita u mjernoj otopini.

### **Linearnost metode**

Linearnost metode je mogućnost metode da se unutar radnog područja dobije izravno proporcionalna ovisnost mjernih rezultata o koncentraciji analita. Za potvrdu linearnosti metode odabere se najmanje pet različitih koncentracijskih točaka. Prikazu se vrijednosti odziva o koncentraciji, te se iz dobivenih podataka izračuna jednadžba pravca i koeficijent regresije.

### **Stabilnost analita i standardnih otopina**

To je vremenski period unutar kojeg su otopine stabilne.

### **Granica detekcije**

To je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne i kvantificirati. Ovaj parametar primjenjuje se samo kod validacija metoda određivanja onečišćenja bilo kvantitativnom metodom ili limit testom.

### **Granica kvantifikacije**

To je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Ovaj parametar se određuje kod kvantitativnih analiza kod kojih je nivo koncentracije analita koji se određuje nizak (npr. metode određivanja onečišćenja i/ili razgradnih produkata).

**Radno područje**

To je interval unutar kojeg analitički postupak ima zadovoljavajuću preciznost, točnost i linearnost. Za definiranje radnog područja metode koriste se podatci dobiveni kod određivanja linearnosti, točnosti i preciznosti metode.

**Otpornost metode**

Ovaj parametar označava otpornost analitičkog postupka na male i namjerne promjene parametara metode. Mijenjaju se radni parametri unutar realnih granica te se prati kvantitativna promjena rezultata. Ako je utjecaj promjene parametra metode unutar specifikacije metode, kaže se da je parametar u području otpornosti metode.

Kod instrumentalnih metoda tipični parametri su promjena pH vrijednosti pokretne faze i promjena sastava pokretne faze (HPLC) te korištenje različitih kolona, rad kod različitih temperatura i brzine protoka (HPLC i GC) i sl.

Postupak provođenja validacije analitičke metode, obrada analitičkih rezultata i izrada validacijske dokumentacije zahtijeva značajan angažman analitičara. Međutim, korištenjem validiranih analitičkih metoda smanjujemo mogućnost analitičke pogreške, a dobivene rezultate možemo smatrati točnima i pouzdanima.

### **3.1. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1.1. Radni standardi (RS)**

- Lidokain radni standard RS (S = 99,9%)
- Metilparahidroksibenzoat RS (S = 100,00%)

#### **3.1.2. Kemikalije**

Za pripravu otopina korištene su sljedeće kemikalije:

- voda, pročišćena
- acetonitril, HPLC čistoće (Sigma Aldrich)
- ledena octena kiselina, HPLC čistoće (Sigma Aldrich)
- natrijev hidroksid, 2 mol/L
- natrijev hidroksid, 0,5 mol/L
- klorovodična kiselina, 4 mol/L
- klorovodična kiselina, 0,5 mol/L
- vodikov peroksid, 3%-tni.

#### **3.1.3. Oprema**

- laboratorijsko suđe
- analitička vaga – Sartorius CP225D
- analitička vaga – Mettler Toledo AX205 DeltaRange
- pH metar – Mettler Toledo SevenEasy
- ultrazvučna kupelj – Bandelin Sonorex RK514h
- vodena kupelj – GFL 1042
- magnetska miješalica K-IKA werke RT5 power
- HPLC sustav Shimadzu LC-2010C<sub>HT</sub>
- HPLC sustav Agilent 1100 Series

### 3.1.4. Kromatografski uvjeti

Instrument: Tekućinski kromatograf s UV detektorom, Shimadzu LC-2010C<sub>HT</sub>, Japan  
(Slika 15.)

Kolona: Macherey-Nagel Nucleosil C18, 5 $\mu$ m, 4,6x100mm, Njemačka  
XTerra RP18 Waters, 5 $\mu$ m, 4,6x150mm (za intermedijarnu preciznost),

SAD

Protok: 1 mL/min

V<sub>inj.</sub>: 20  $\mu$ L

UV: 254 nm

Temperatura kolone: sobna (25 °C)

Temperatura uzorka: sobna (25 °C)

Vrijeme analize: 6 min

Pokretna faza: 3,2 (71,11%) volumena pufera (pH=3,4) i 1,3 (28,89%) volumena acetonitrila

- pufer pH 3,4 – pomiješa se 50 mL ledene octene kiseline i 930 mL pročišćene vode te se podesi pH na 3,4 sa 1 M NaOH.

### 3.1.5. Metode

#### **3.1.5.1. Priprema poredbene otopine lidokaina**

Pripremi se poredbena otopina lidokaina RS masene koncentracije 2,0 mg/mL pokretnoj fazi.

#### **3.1.5.2. Priprema ispitivane otopine**

Prenese se 1,0 mL Lidokain spreja u odmjernu tikvicu od 50 mL, dopuni pokretnom fazom do oznake i promiješa.

#### **3.1.5.3. Priprema otopine placebo**

Prenese se 1,0 mL *placeba* bez lidokaina u odmjernu tikvicu od 50 mL, dopuni pokretnom fazom do oznake i promiješa.

#### **3.1.5.4. Priprema otopine za pogodnost sustava i uvjeti pogodnosti sustava**

Točnim vaganjem na analitičkoj vagi određene mase metilparahidroksibenzoat RS te njegovim otapanjem u pokretnoj fazi pripremi se otopina masene koncentracije 0,22 mg/mL. Tako pripremljena otopina se zatim pomiješa u zadanom omjeru s poredbenom otopinom 1.

Nakon 3 uzastopna injektiranja poredbene otopine 1 i poredbene otopine 2 kriteriji koji moraju biti zadovoljeni su sljedeći:

- Vrijeme zadržavanja lidokaina na Nucleosil C18 koloni je oko 2,25 minuta, a metilhidroksibenzoata oko 3,92 min.

- Rezolucija između pika lidokaina i pika metilhidroksibenzoata mora biti  $\geq 3,0$ .

- Za poredbenu otopinu 1 i poredbenu otopinu 2 relativna standardna devijacija (*RSD*) za lidokain mora biti  $\leq 1,5\%$ .

- Odstupanje između faktora odgovora detektora (*RF*) poredbene otopine 1 i poredbene otopine 2 mora biti  $\leq 1,0\%$  (*RSD*).

#### **3.1.5.5. Radni postupak**

Nakon što su zadovoljeni kriteriji za pogodnost sustava injektiraju se ispitivane i poredbene otopine prema sljedećem redoslijedu:

1. Injektira se najviše 6 ispitivanih otopina, svaka otopina dva puta.

2. Injektira se poredbena otopina 1 dva puta.

3. Injektira se novih 6 ispitivanih otopina, svaka otopina dva puta.

4. Injektira se poredbena otopina 2 dva puta.

Ponavlja se postupak od 1 do 4. Za poredbenu otopinu 1 i poredbenu otopinu 2 (sva injektiranja) izračuna se srednja vrijednost faktora odgovora detektora ( $RF_{av}$ ).

### **3.1.5.6. Račun**

Sadržaj lidokain u Lidokain spreju određuje se uz dvije paralelno pripremljene poredbene otopine prema izrazu:

$$\text{mg/mL} = \frac{A_{uz} \times RF_{av} \times V_{uz} \times S}{100} \quad (1)$$

$$RF_{av} = \frac{RF_1 + RF_2}{2} \quad RF_1 = \frac{W_{st1}}{A_{st1} \times V_{st}} \quad RF_2 = \frac{W_{st2}}{A_{st2} \times V_{st}} \quad (2)$$

$A_{uz}$  – srednja vrijednost površine pika lidokaina na kromatogramu ispitivane otopine

$A_{st1}$  – srednja vrijednost površine pika lidokaina na kromatogramu poredbene otopine 1

$A_{st2}$  – srednja vrijednost površine pika lidokaina na kromatogramu poredbene otopine 2

$W_{st1}$  – masa odvagane lidokain standarda 1 (mg)

$W_{st2}$  – masa odvagane lidokain standarda 2 (mg)

$RF_{av}$  – srednja vrijednost faktora odgovora detektora

$RF_1$  – faktor odgovora detektora za lidokain standard 1

$RF_2$  – faktor odgovora detektora za lidokain standard 2

$V_{uz}$  – faktor razrjeđenja ispitivane otopine ( $V_{uz} = 50$ )

$V_{st}$  – faktor razrjeđenja poredbene otopine ( $V_{st} = 50$ )

$S$  – sadržaj lidokaina u radnom standardu (%)

## 3.2. POSTUPAK VALIDACIJE METODE [9]

### 3.2.1. Selektivnost

Selektivnost metode određuje se usporedbom kromatograma diluenta, *placeba*, uzorka i standarda lidokaina. Na vremenu zadržavanja lidokaina ne smije biti interferirajućih pikova diluenta i *placeba*.

#### 3.2.1.1. Razaranje uzoraka

Mogući razgradni produkti lidokaina određuju se tretiranjem uzorka, *placeba* i *placeba* s dodanim standardom lidokaina kod točke 100% kiselinom, lužinom i peroksidom. Tretirani uzorci pripremaju se prema sljedećem postupku:

- Prenese se 5,0 mL 0,5 M HCl u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL, uzorak se zagrijava na vodenoj kupelji na 90 °C uz povratno hladilo šest sati. Ohladi se na sobnu temperaturu, doda 5,0 mL 0,5 M NaOH, prenese s pokretnom fazom u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopuni do oznake pokretnom fazom.
- Prenese se 5,0 mL 0,5 M NaOH u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL i uzorak se zagrijava na vodenoj kupelji na 90 °C uz povratno hladilo šest sati. Ohladi se na sobnu temperaturu, doda 5,0 mL 0,5 M HCl, prenese s pokretnom fazom u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopuni do oznake pokretnom fazom.
- Prenese se 5,0 mL 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL i uzorak se zagrijava 8 minuta na vodenoj kupelji na 50 °C. Ohladi se na sobnu temperaturu, prenese s pokretnom fazom u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopuni do oznake pokretnom fazom.
- Prenese se 1,0 mL *placeba* u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL, doda se 5,0 mL 0,5 M HCl i uzorak se zagrijava na vodenoj kupelji na 90 °C uz povratno hladilo šest sati. Ohladi se na sobnu temperaturu, doda 5,0 mL 0,5 M NaOH, kvantitativno prenese s pokretnom fazom u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopuni do oznake pokretnom fazom.
- Prenese se 1,0 mL *placeba* u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL, doda se 5,0 mL 0,5 M NaOH i uzorak se zagrijava na vodenoj kupelji na 90 °C uz povratno hladilo šest sati. Ohladi se na sobnu temperaturu, doda 5,0 mL 0,5 M HCl,

- kvantitativno prenese s pokretnom fazom u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopuni do oznake pokretnom fazom.
- Prenese se 1,0 mL *placeba* u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL, doda se 5,0 mL 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i uzorak se zagrijava 8 minuta na vodenoj kupelji na 50 °C. Ohladi se na sobnu temperaturu, kvantitativno prenese s pokretnom fazom u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopuni do oznake pokretnom fazom.
  - Točno se odvažuje oko 100,0 mg lidokaina RS u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL, doda se 1,0 mL *placeba* i 5,0 mL 0,5 M HCl i zagrijava na vodenoj kupelji na 90 °C uz povratno hladilo šest sati. Ohladi se na sobnu temperaturu, doda 5,0 mL 0,5 M NaOH, kvantitativno prenese s pokretnom fazom u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopuni do oznake pokretnom fazom.
  - Točno se odvažuje oko 100,0 mg lidokaina RS u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL, doda 1,0 mL *placeba* i 5,0 mL 0,5 M NaOH i zagrijava na vodenoj kupelji na 90 °C uz povratno hladilo šest sati. Ohladi se na sobnu temperaturu, doda 5,0 mL 0,5 M HCl, kvantitativno prenese s pokretnom fazom u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopuni do oznake pokretnom fazom.
  - Točno se odvažuje oko 100,0 mg lidokaina RS u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL, doda 1,0 mL *placeba* i 5,0 mL 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i zagrijava 8 minuta na vodenoj kupelji na 50 °C. Ohladi se na sobnu temperaturu, kvantitativno prenese s pokretnom fazom u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopuni do oznake pokretnom fazom.
  - Točno se odvažuje oko 100,0 mg lidokaina RS u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL, doda 5,0 mL 0,5 M HCl i zagrijava na vodenoj kupelji na 90 °C uz povratno hladilo šest sati. Ohladi se na sobnu temperaturu, doda 5,0 mL 0,5 M NaOH, kvantitativno prenese s pokretnom fazom u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopuni do oznake pokretnom fazom.
  - Točno se odvažuje oko 100,0 mg lidokaina RS u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL, doda 5,0 mL 0,5 M NaOH i zagrijava na vodenoj kupelji na 90 °C uz povratno hladilo šest sati. Ohladi se na sobnu temperaturu, doda 5,0 mL 0,5 M HCl, kvantitativno prenese s pokretnom fazom u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopuni do oznake pokretnom fazom.



- Točno se odvažuje oko 100,0 mg lidokaina RS u tikvicu s okruglim dnom od 50 mL, doda 5,0 mL 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i zagrijava 8 minuta u vodenoj kupelji na 50 °C. Ohladi se na sobnu temperaturu, kvantitativno prenese s pokretnom fazom u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopuni do oznake pokretnom fazom.

U tretiranim uzorcima *placeba* i diluenta ne smije biti interferirajućih komponenata na vremenu zadržavanja lidokaina. Za svaku komponentu određuje se čistoća pika.

### **3.2.2. Pogodnost sustava**

Pogodnost sustava određuje se na dvije zasebno pripremljene poredbene otopine lidokaina. Za sva injektiranja poredbene otopine izračuna se % *RSD* površine pikova. Svaka poredbena otopina injektira se najmanje 6 puta. Izračuna se faktor odgovora (*RF*) za svaku poredbenu otopinu i % *RSD* između faktora odgovora poredbene otopine 1 (*RF*<sub>1</sub>) i faktora odgovora poredbene otopine 2 (*RF*<sub>2</sub>).

### **3.2.3. Preciznost**

#### **3.2.3.1. Ponovljivost**

Ponovljivost se određuje mjerenjem 6 zasebno pripremljenih uzoraka Lidokain spreja. Uzorci se pripremaju i analiziraju prema analitičkoj metodi. Svaki uzorak injektira se dva puta. Sadržaj lidokaina određuje se uz dvije paralelno pripremljene poredbene otopine. Za 6 određivanja izračuna se srednja vrijednost, relativno standardno odstupanje (%) *RSD* i interval pouzdanosti (*CI*) uz 95% vjerojatnost.

#### **3.2.3.2. Intermedijarna preciznost**

Intermedijarna preciznost određuje se mjerenjem 6 zasebno pripremljenih uzorka Lidokain spreja, pripremljenih drugi dan, na drugom HPLC sistemu i analizu provodi drugi analitičar. Uzorci se pripremaju i analiziraju prema analitičkoj metodi. Svaki uzorak injektira se dva puta. Sadržaj lidokaina određuje se uz dvije paralelno pripremljene poredbene otopine. Za 6 određivanja sadržaja lidokaina izračuna se srednja

vrijednost, relativno standardno odstupanje (%) *RSD* i interval pouzdanosti (*CI*) uz 95% vjerojatnost.

Izračuna se razlika srednjih vrijednosti sadržaja lidokaina dobivenih kod ispitivanja ponovljivosti i intermedijarne preciznosti.

#### **3.2.4. Linearnost**

Linearnost metode određuje se na uzorcima *placeba* kojima je dodana poznata koncentracija standarda lidokaina. Linearnost metode određuje se kod 6 točaka u području koncentracija lidokaina od 40%, 60%, 80%, 100%, 120% i 140%. Za svaku točku priprema se po jedna otopina i svaki uzorak injektira se dva puta.

Uzorci za linearnost pripremaju se prema sljedećem postupku:

- 40% - Pripremi se otopina lidokaina RS masene koncentracije 0,8 mg/mL u pokretnoj fazi, doda 1,0 mL *placeba*, promućka i dopuni do oznake pokretnom fazom.
- 60% - Pripremi se otopina lidokaina RS masene koncentracije 1,2 mg/mL u pokretnoj fazi, doda 1,0 mL *placeba*, promućka i dopuni do oznake pokretnom fazom.
- 80% - Pripremi se otopina lidokaina RS masene koncentracije 1,6 mg/mL u pokretnoj fazi, doda 1,0 mL *placeba*, promućka i dopuni do oznake pokretnom fazom.
- 100% - Pripremi se otopina lidokaina RS masene koncentracije 2,0 mg/mL u pokretnoj fazi, doda 1,0 mL *placeba*, promućka i dopuni do oznake pokretnom fazom.
- 120% - Pripremi se otopina lidokaina RS masene koncentracije 2,4 mg/mL u pokretnoj fazi, doda 1,0 mL *placeba*, promućka i dopuni do oznake pokretnom fazom.
- 140% - Pripremi se otopina lidokaina RS masene koncentracije 2,8 mg/mL u pokretnoj fazi, doda 1,0 mL *placeba*, promućka i dopuni do oznake pokretnom fazom.

Za lidokain izračuna se jednadžba pravca (nagib i odsječak pravca) i koeficijent regresije.

#### **3.2.5. Točnost**

Točnost metode određuje se na uzorcima *placeba* kojima je dodana poznata koncentracija standarda lidokaina. Točnost metode određuje se kod tri točke u području koncentracija lidokaina od 80%, 100% i 120%. Za svaku točku pripremaju se po tri otopine. Svaki uzorak injektira se dva puta. Sadržaj lidokaina određuje se uz dvije paralelno

pripremljene poredbene otopine. Za svaku koncentraciju izračuna se povrat i relativno standardno odstupanje.

Uzorci za točnost pripremaju se kako je opisano u točki 3.2.4.

### **3.2.6. Stabilnost mjernih otopina**

#### **3.2.6.1. Stabilnost otopine standarda lidokaina**

Stabilnost otopine standarda lidokaina određuje se usporedbom faktora odgovora detektora (*RF*) dvije svježe zasebno pripremljene otopine i otopina čuvanih u automatskom uzorkivaču unutar 48 sati kod sobne temperature. Otopine standarda se pripremaju i analiziraju prema analitičkoj metodi. Za svaku otopinu standarda, za svaki vremenski interval, izračuna se omjer *RF* vrijednosti standarda čuvanog u automatskom uzorkivaču na sobnoj temperaturi i svježe pripremljenog standarda.

#### **3.2.6.2. Stabilnost uzoraka**

Stabilnost uzoraka određuje se na tri paralelno pripremljena uzorka Lidokain spreja prema analitičkoj metodi. Svaki uzorak injektira se dva puta. Stabilnost uzoraka određuje se nakon čuvanja uzoraka u automatskom uzorkivaču unutar 48 sati na sobnoj temperaturi. Sadržaj lidokaina određuje se uz dvije svježe paralelno pripremljene poredbene otopine. Izračuna se razlika srednje vrijednosti sadržaja lidokaina dobivenog u određenim vremenskim intervalima u odnosu na inicijalnu vrijednost.

### **3.2.7. Otpornost**

Otpornost metode za određivanje sadržaja lidokaina u Lidokain spreju određuje se malom promjenom kritičnih parametara kao što su protok, omjer organske faze u pokretnoj fazi, pH pokretne faze i temperature kolone.

Ispituje se utjecaj sljedećih parametara:

- Promjena protoka za  $\pm 0,2$  mL/min.
- Promjena sastava acetonitrila u pokretnoj fazi za  $\pm 0,2$  volumena.
- Promjena temperature kolone za  $\pm 5$  °C.
- Promjena pH pufera za  $\pm 0,25$  pH jedinica.

Utjecaj svakog ispitivanog kromatografskog parametra na pogodnost sustava određuje se na dvjema paralelno pripremljenim poredbenim otopinama koje se pripremaju po analitičkoj metodi. Poredbene otopine injektiraju se najmanje pet puta.

#### **3.2.7.1. Promjena protoka za $\pm 0,2$ mL/min**

Utjecaj promjene protoka pokretne faze određuje se analizom poredbenih otopina kod protoka 0,8 mL/min i 1,2 mL/min. Prema analitičkoj metodi protok pokretne faze je 1,0 mL/min.

#### **3.2.7.2. Promjena sastava pokretne faze za $\pm 0,2$ volumena**

Utjecaj promjene sastava pokretne faze određuje se analizom poredbenih otopina kod pokretnih faza 1 i 2.

Pokretna faza 1: 3,0 (66,67%) volumena pufera pH=3,4 (50 mL ledene octene kiseline + 930 mL vode) i 1,5 (33,33%) volumena acetonitrila.

Pokretna faza 2: 3,4 (75,56%) volumena pufera pH=3,4 (50 mL ledene octene kiseline + 930 mL vode) i 1,1 (24,44%) volumena acetonitrila.

Pokretna faza prema analitičkoj metodi: 3,2 (71,11%) volumena pufera pH=3,4 (50 mL ledene octene kiseline + 930 mL vode, pH=3,4) i 1,3 (28,89%) volumena acetonitrila.

#### **3.2.7.3. Promjena temperature kolone za $\pm 5$ °C**

Utjecaj promjene temperature kolone određuje se analizom poredbenih otopina kod temperature kolone od 20 °C i 30 °C. Prema analitičkoj metodi temperatura kolone je 25 °C.

#### **3.2.7.4. Promjena pH pufera za $\pm 0,25$ pH jedinica**

Utjecaj promjene pH pufera određuje se analizom poredbenih otopina kod pH pufera 3,15 i 3,65. Prema analitičkoj metodi pH pufera je 3,40.

U tablici 4 sumirani su svi parametri validacije uz odgovarajuće kriterije prihvatljivosti.

Tablica 4. Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti

<b>Parametri</b>	<b>Kriterij prihvatljivosti</b>
<b>Selektivnost</b> Utjecaj diluenta i <i>placeba</i>  Tretirani uzorci	Nema interferirajućih pikova diluenta i <i>placeba</i> s pikom lidokaina  Indeks čistoće pika lidokaina mora biti > 0,95.
<b>Pogodnost sustava</b> Vrijeme zadržavanja lidokaina  % <i>RSD</i> za lidokain standard % <i>RSD</i> za <i>RF</i> vrijednost	~ 2,25 minuta  ≤ 1,5% ≤ 1,0%
<b>Preciznost</b> Ponovljivost % <i>RSD</i> , n=6  Intermedijarna preciznost % <i>RSD</i> , n=6  Razlika srednjih vrijednosti dobivenih kod ispitivanja ponovljivosti i intermedijarne preciznosti	≤ 2,0%  ≤ 2,0%  $\Delta \leq \pm 2,0\%$
<b>Linearnost</b> Jednadžba pravca za lidokain, n=6 $R^2$  Odsječak na osi <i>y</i> za signal koji odgovara 100% koncentraciji lidokaina	≥ 0,9990  ≤ 5,0%
<b>Točnost</b> Povrat za lidokain, n=3 % <i>RSD</i> , n=3  Povrat za lidokain, n=9 % <i>RSD</i> , n=9	98,0%-102,0% ≤ 2,0%  98,0%-102,0% ≤ 2,0%
<b>Stabilnost mjernih otopina</b>  Stabilnost otopine standarda lidokaina Omjer <i>RF</i> vrijednosti standarda čuvanog u automatskom uzorkivaču na sobnoj temperaturi i svježe pripremljenog standarda  Stabilnost uzorka Razlika između vrijednosti dobivenih kod različitih vremenskih intervala	98,0%-102,0%  $\Delta \leq \pm 2,0\%$
<b>Robustnost</b>  <b>Promjena protoka za ± 0,2 mL/min</b>  <b>Poredbena otopina</b>  Vrijeme zadržavanja lidokaina % <i>RSD</i> za lidokain standard % <i>RSD</i> za <i>RF</i> vrijednost	n/p ≤ 1,5% ≤ 1,0%

Tablica 4. Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti (**nastavak 1**)

<b>Parametri</b>	<b>Kriterij prihvatljivosti</b>
<p><b>Promjena sastava mobilne faze za <math>\pm 0,2</math> volumena acetonitrila</b></p> <p><b>Poredbena otopina</b></p> <p>Vrijeme zadržavanja lidokaina                      % <i>RSD</i> za lidokain RS standard                      % <i>RSD</i> za <i>RF</i> vrijednost</p>	<p>n/p  <math>\leq 1,5\%</math>  <math>\leq 1,0\%</math></p>
<p><b>Promjena pH pufera za <math>\pm 0,25</math> pH jedinica</b></p> <p><b>Poredbena otopina</b></p> <p>Vrijeme zadržavanja lidokaina                      % <i>RSD</i> za lidokain RS standard                      % <i>RSD</i> za <i>RF</i> vrijednost</p>	<p>n/p  <math>\leq 1,5\%</math>  <math>\leq 1,0\%</math></p>
<p><b>Promjena temperature kolone za <math>\pm 5</math> °C</b></p> <p><b>Poredbena otopina</b></p> <p>Vrijeme zadržavanja lidokaina                      % <i>RSD</i> za lidokain RS standard                      % <i>RSD</i> za <i>RF</i> vrijednost</p>	<p>n/p  <math>\leq 1,5\%</math>  <math>\leq 1,0\%</math></p>

#### **4.1. Validacija HPLC metode**

Validacija HPLC metode za određivanje sadržaja lidokaina provedena je na Lidokain spreju (serijski broj: 25821022). Metoda je validirana na Shimadzu LC-2010C<sub>HT</sub> HPLC sustavu sa Macherey-Nagel Nucleosil C18, 5 $\mu$ m, 4,6x100mm kolonom.

#### **4.2. Selektivnost metode**

Selektivnost metode određena je usporedbom kromatograma diluenta, uzorka, standarda lidokaina i *placeba* te *placeba* i standarda lidokaina tretiranih kiselinom, lužinom i peroksidom. Kod uzoraka tretiranih kiselinom i lužinom pri prethodno navedenim uvjetima (na 90 °C uz povratno hladilo šest sati) nije zabilježen raspad lidokaina. Za uzorke koji su tretirani peroksidom morali su se naći blaži uvjeti razaranja (8 minuta na 50 °C) da bi došlo do 10-30%-tnog raspada lidokaina. Metoda zadovoljava sve zadane kriterije za selektivnost. Zadovoljena je i čistoća pikova. Metoda za određivanje sadržaja lidokaina u Lidokain spreju je selektivna. Selektivnost metode prikazana je u Prilogu 1 (Slike 10.-14.).

#### **4.3. Pogodnost sustava**

Pogodnost sustava određena je na dvije zasebno pripremljene poredbene otopine lidokaina. Za sva injektiranja poredbene otopine izračunat je % *RSD* površine pikova. Svaka poredbena otopina injektirana je 6 puta. Izračunat je faktor odgovora (*RF*) za svaku poredbenu otopinu i % *RSD* između faktora odgovora poredbene otopine 1 (*RF*<sub>1</sub>) i faktora odgovora poredbene otopine 2 (*RF*<sub>2</sub>).

Tablica 5. Pogodnost sustava

	Pogodnost sustava	
	Zahtjev:	Analiza:
$R_t(\text{lidokain})$ :	2,25	2,01
$R_t(\text{MHB})$ :	3,92	3,58
$R_s$	>3,0	6,15

Vrijeme zadržavanja lidokaina i metilhidroksibenzoata odgovara zahtijevanom vremenu, kao što je prikazano u tablici 5.

Tablica 6. Pogodnost sustava za određivanje sadržaja lidokaina

	ST 1	ST 2
Injektiranje br.	površina	površina
1	4446649	4445195
2	4448322	4446359
3	4448250	4445312
4	4449233	4452389
5	4448194	4453588
6	4451061	4455873
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>4448618</b>	<b>4449786</b>
<b>STD</b>	<b>1457,8</b>	<b>4714,2</b>
<b>RSD(%)</b>	<b>0,03</b>	<b>0,11</b>
<b>RF</b>	<b><math>4,49 \times 10^{-7}</math></b>	<b><math>4,49 \times 10^{-7}</math></b>

Rasipanje rezultata opisano je relativnim standardnim odstupanjem (*RSD*) i za opisanu metodu *RSD* mora biti  $\leq 1,5\%$ . Iz tablice 6 vidimo da je kriterij zadovoljen.

Tablica 7. Pogodnost sustava - podudaranje standarda

RS	RF
1	$4,49398 \times 10^{-7}$
2	$4,49415 \times 10^{-7}$
<b>Srednja vrijednost</b>	<b><math>4,49406 \times 10^{-7}</math></b>
<b>STD</b>	<b><math>1,19464 \times 10^{-11}</math></b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,003</b>

*RSD* za *RF* vrijednost mora biti  $\leq 1,0\%$ . Kriterij je zadovoljen (Tablica 7).



#### 4.4. Preciznost metode

Ponovljivost je određena mjerenjem 6 zasebno pripremljenih uzoraka Lidokain spreja. Ispitana je i intermedijarna preciznost na 6 zasebno pripremljenih uzoraka Lidokain spreja pripremljenih drugi dan, na drugom HPLC sustavu, a analizu je proveo drugi analitičar. Svaki uzorak injektiran je dva puta.

Tablica 8. Preciznost mjerenja – ponovljivost

Uzorak, broj i oznaka	Srednja površina oba injektiranja	mg/mL u uzorku	% od propisanog
UZ 1A	4489826	100,8	<b>100,8</b>
UZ 1B	4487233	100,7	<b>100,7</b>
UZ 1C	4473550	100,4	<b>100,4</b>
UZ 1D	4473596	100,4	<b>100,4</b>
UZ 1E	4506000	101,2	<b>101,2</b>
UZ 1F	4484272	100,7	<b>100,7</b>
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>100,7</b>	<b>100,7</b>	
<b>STD</b>	<b>0,27</b>	<b>0,27</b>	
<b>RSD (%)</b>	<b>0,27</b>	<b>0,27</b>	

Kao što je prikazano u tablici 8, RSD je 0,27% na 6 uzoraka, što zadovoljava kriterij  $\leq 2,0\%$ .

Tablica 9. Intermedijarna preciznost

Uzorak	%
UZ 1A	100,1
UZ 1B	99,8
UZ 1C	100,0
UZ 1D	99,9
UZ 1E	99,7
UZ 1F	100,1
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>99,9</b>
<b>STD</b>	<b>0,18</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,18</b>

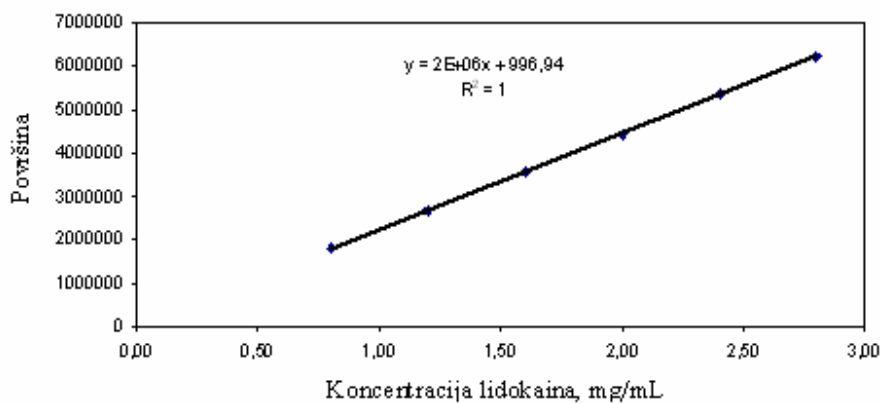
Iz tablice 9 vidimo da je razlika srednje vrijednosti dobivene kod ispitivanja ponovljivosti i intermedijarne preciznosti 0,8%. Zadovoljen je kriterij  $\Delta \leq \pm 2,0\%$ . Metoda je precizna.

#### 4.5. Linearnost

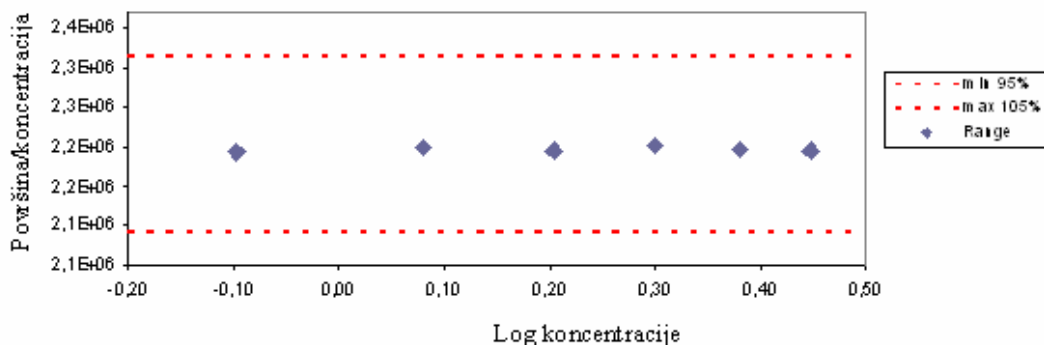
Linearnost metode određena je na uzorcima *placeba* kojima je dodana poznata koncentracija standarda lidokaina. Određena je kod 6 točaka u području koncentracija lidokaina od 40%, 60%, 80%, 100%, 120% i 140%.

Tablica 10. Linearnost

Točke	Dodano mg/mL	Srednja površina oba injektiranja	Nađeno mg/mL
40%	0,7994	1778403	0,8001
60%	1,2002	2675129	1,2035
80%	1,6002	3562258	1,6026
100%	2,0000	4464165	2,0084
120%	2,4002	5349040	2,4065
140%	2,8006	6232538	2,8040



Slika 4. Linearnost metode za određivanje sadržaja lidokaina



Slika 5. Područje linearnosti

Iz tablice 10 te iz slika 4 i 5 vidimo da je metoda linearna u zadanom opsegu od 40% do 140% propisane količine lidokaina, uz koeficijent regresije veći od 0,9990.

#### 4.6. Točnost

Točnost metode određena je na uzorcima *placeba* kojima je dodana poznata koncentracija standarda lidokaina. Određena je kod 3 točke u području koncentracija lidokaina od 80%, 100% i 120%.

Tablica 11. Točnost metode za određivanje sadržaja lidokaina

Točke	Dodano mg/mL	Srednja površina oba injektiranja	Nađeno mg/mL	Povrat %
<b>80% a</b>	1,6002	3562258	1,6026	<b>100,2</b>
<b>80% b</b>	1,5996	3553399	1,6023	<b>100,2</b>
<b>80% c</b>	1,5992	3558256	1,6045	<b>100,3</b>
<b>100% a</b>	2,0000	4464165	2,0084	<b>100,4</b>
<b>100% b</b>	1,9998	4448472	2,0059	<b>100,3</b>
<b>100% c</b>	1,9994	4441553	2,0027	<b>100,2</b>
<b>120% a</b>	2,4002	5349040	2,4065	<b>100,3</b>
<b>120% b</b>	2,4000	5315941	2,3970	<b>99,9</b>
<b>120% c</b>	2,4000	5343750	2,4096	<b>100,4</b>
			<b>Srednja vrijednost</b>	<b>100,2</b>
			<b>STD</b>	<b>0,19</b>
			<b>RSD (%)</b>	<b>0,19</b>

Iz tablice 11 vidimo da su svi rezultati za povrat su unutar granica od 98,0%-102,0%. RSD je 0,19%, dakle manji je od 2,0%. Metoda je točna.

## 4.7. Stabilnost mjernih otopina

### 4.7.1. Stabilnost otopine standarda lidokaina

Stabilnost otopine standarda lidokaina određena je usporedbom faktora odgovora detektora (*RF*) dvije svježe zasebno pripremljene otopine i otopina čuvanih u automatskom uzorkivaču unutar 48 sati kod sobne temperature.

Tablica 12. Stabilnost otopine standarda lidokaina

Vrijeme/h	<i>RF</i> za ST 1	<i>RF</i> za ST 2
0	$4,49 \times 10^{-7}$	$4,49 \times 10^{-7}$
24	$4,47 \times 10^{-7}$	$4,44 \times 10^{-7}$
<b>Podudaranje <i>RF</i></b>	<b>99,4</b>	<b>98,9</b>
0	$4,50 \times 10^{-7}$	$4,49 \times 10^{-7}$
48	$4,44 \times 10^{-7}$	$4,39 \times 10^{-7}$
<b>Podudaranje <i>RF</i></b>	<b>98,5</b>	<b>97,8</b>

Iz tablice 12 vidimo da su omjeri *RF* vrijednosti standarda čuvanog u automatskom uzorkivaču na sobnoj temperaturi i svježe pripremljenog standarda unutar granica od 98,0%-102,0% za 24 sat. Za 48 sati vidimo malo odstupanje. Zaključno, otopina standarda lidokaina stabilna je 24 sata na sobnoj temperaturi.

#### 4.7.2. Stabilnost uzoraka

Stabilnost uzoraka određena je nakon čuvanja uzoraka u automatskom uzorkivaču unutar 48 sati na sobnoj temperaturi te je uspoređena sa sadržajem lidokaina svježe pripremljene poredbene otopine. Izračunata je razlika srednje vrijednosti sadržaja lidokaina dobivenog u određenim vremenskim intervalima u odnosu na inicijalnu vrijednost.

Tablica 13. Stabilnost uzoraka

Vrijeme	Uzorak, broj i oznaka	Srednja površina oba injektiranja	mg/mL u uzorku	$\Delta$ (u odnosu na 0 h)
0 h	UZ 1A	4489826	100,8	
	UZ 1B	4487233	100,7	
	UZ 1C	4473550	100,4	
24 h	UZ 1 stb 24h	4511841	101,4	0,6
	UZ 2 stb 24h	4515232	101,5	0,8
	UZ 3 stb 24h	4491340	100,9	0,5
48 h	UZ 1 stb 48h	4534383	102,1	1,3
	UZ 2 stb 48h	4555168	102,6	1,9
	UZ 3 stb 48h	4508268	101,5	1,1

U tablici 13 vidimo da stabilnost uzoraka zadovoljava sve zadane kriterije, tj. razlika između srednje vrijednosti sadržaja lidokaina dobivenog u određenim vremenskim intervalima u odnosu na inicijalnu vrijednost je unutar zadanih 2,0%. Uzorci su stabilni 48 sati na sobnoj temperaturi.

#### 4.8. Otpornost

Otpornost metode za određivanje sadržaja lidokaina u Lidokain spreju određena je malom promjenom kritičnih parametara kao što su protok, omjer organske faze u pokretnoj fazi, pH pokretne faze i temperature kolone.

#### 4.8.1. Promjena protoka za $\pm 0,2$ mL/min

Utjecaj promjene protoka pokretne faze određen je analizom poredbenih otopina kod protoka 0,8 mL/min i 1,2 mL/min. Prema analitičkoj metodi protok pokretne faze je 1,0 mL/min.

Tablica 14. Otpornost kod protoka 0,8 mL/min

	<b>ST 1</b>	<b>ST 2</b>
<b>Injektiranje br.</b>	<b>površina</b>	<b>površina</b>
1	5550875	5540445
2	5549912	5547268
3	5552250	5545103
4	5555936	5547032
5	5551163	5541495
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>5552027</b>	<b>5544269</b>
<b>STD</b>	<b>2338,6</b>	<b>3148,1</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,04</b>	<b>0,06</b>
<b>RF</b>	<b><math>3,60 \times 10^{-7}</math></b>	<b><math>3,61 \times 10^{-7}</math></b>

Tablica 15. Protok 0,8 mL/min - podudaranje standarda

<b>RS</b>	<b>RF</b>
<b>1</b>	$3,60265 \times 10^{-7}$
<b>2</b>	$3,60697 \times 10^{-7}$
<b>Srednja vrijednost</b>	<b><math>3,60481 \times 10^{-7}</math></b>
<b>STD</b>	<b><math>3,05474 \times 10^{-10}</math></b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,08</b>

Iz tablica 14 i 15 vidimo da su *RSD* za lidokain standard i *RSD* za *RF* vrijednost unutar dozvoljenih granica od  $\leq 1,5\%$ , odnosno  $\leq 1,0\%$ . Smanjenje protoka za 0,2 mL/min nema utjecaja na metodu.

Tablica 16. Otpornost metode kod protoka 1,2 mL/min

	<b>ST 1</b>	<b>ST 2</b>
<b>Injektiranje br.</b>	<b>površina</b>	<b>površina</b>
1	3695648	3687909
2	3695853	3682141
3	3695545	3688069
4	3695520	3681240
5	3696185	3680373
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>3695750</b>	<b>3683946</b>
<b>STD</b>	<b>276,2</b>	<b>3743,4</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,01</b>	<b>0,10</b>
<b>RF</b>	<b>5,41 x 10<sup>-7</sup></b>	<b>5,43 x 10<sup>-7</sup></b>

Tablica 17. Protok 1,2 mL/min – podudaranje standarda

<b>RS</b>	<b>RF</b>
<b>1</b>	5,41216 x 10 <sup>-7</sup>
<b>2</b>	5,42842 x 10 <sup>-7</sup>
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>5,42029 x 10<sup>-7</sup></b>
<b>STD</b>	<b>1,14943 x 10<sup>-7</sup></b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,21</b>

Iz tablica 16 i 17 vidimo da su *RSD* za lidokain standard i *RSD* za *RF* vrijednost unutar dozvoljenih granica od  $\leq 1,5\%$ , odnosno  $\leq 1,0\%$ . Povećanje protoka za 0,2 mL/min nema utjecaja na metodu.

#### 4.8.2. Promjena sastava pokretne faze za $\pm 0,2$ volumena

Utjecaj promjene sastava pokretne faze određen je analizom poredbenih otopina primjenom pokretnih faza 1 i 2, pri čemu je početna pokretna faza koja je modificirana, slijedećeg sastava: 3,2 (71,11%) volumena pufera pH=3,4 (50 mL ledene octene kiseline + 930 mL vode) i 1,3 (28,89%) volumena acetonitrila.

Pokretna faza 1: 3,0 (66,67%) volumena pufera pH=3,4 (50 mL ledene octene kiseline + 930 mL vode) i 1,5 (33,33%) volumena acetonitrila.



Tablica 18. Otpornost metode kod promjene sastava pokretne faze  
(pf 1 – više acetonitrila)

	<b>ST 1</b>	<b>ST 2</b>
<b>Injektiranje br.</b>	<b>površina</b>	<b>površina</b>
1	4426348	4449185
2	4427830	4450077
3	4427361	4450283
4	4428263	4448275
5	4427931	4450731
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>4427547</b>	<b>4449710</b>
<b>STD</b>	<b>743,7</b>	<b>979,8</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>
<b>RF</b>	<b>4,52 x 10<sup>-7</sup></b>	<b>4,50 x 10<sup>-7</sup></b>

Tablica 19. Više acetonitrila - podudaranje standarda

<b>RS</b>	<b>RF</b>
<b>1</b>	4,51763 x 10 <sup>-7</sup>
<b>2</b>	4,49512 x 10 <sup>-7</sup>
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>4,50638 x 10<sup>-7</sup></b>
<b>STD</b>	<b>1,59112 x 10<sup>-9</sup></b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,35</b>

Iz tablica 18 i 19 vidimo da su *RSD* za lidokain standard i *RSD* za *RF* vrijednost unutar dozvoljenih granica od  $\leq 1,5\%$ , odnosno  $\leq 1,0\%$ . Promjena sastava pokretne faze (više acetonitrila) nema utjecaja na metodu.

Pokretna faza 2: 3,4 (75,56%) volumena pufera pH=3,4 (50 mL ledene octene kiseline + 930 mL vode) i 1,1 (24,44%) volumena acetonitrila.

Tablica 20. Otpornost metode kod promjene sastava pokretne faze  
(pf 2 – manje acetonitrila)

	<b>ST 1</b>	<b>ST 2</b>
<b>Injektiranje br.</b>	<b>površina</b>	<b>površina</b>
1	4401416	4419652
2	4398523	4419561
3	4401834	4420272
4	4399155	4420154
5	4402315	4417846
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>4400649</b>	<b>4419497</b>
<b>STD</b>	<b>1697,1</b>	<b>972,9</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,04</b>	<b>0,02</b>
<b>RF</b>	<b>4,55 x 10<sup>-7</sup></b>	<b>4,53 x 10<sup>-7</sup></b>

Tablica 21. Manje acetonitrila - podudaranje standarda

<b>RS</b>	<b>RF</b>
<b>1</b>	4,54524 x 10 <sup>-7</sup>
<b>2</b>	4,52585 x 10 <sup>-7</sup>
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>4,53555 x 10<sup>-7</sup></b>
<b>STD</b>	<b>1,37070 x 10<sup>-9</sup></b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,30</b>

Iz tablica 20 i 21 vidimo da su *RSD* za lidokain standard i *RSD* za *RF* vrijednost unutar dozvoljenih granica od  $\leq 1,5\%$ , odnosno  $\leq 1,0\%$ . Promjena sastava pokretne faze (manje acetonitrila) nema utjecaja na metodu.

#### 4.8.3. Promjena temperature kolone za $\pm 5$ °C

Utjecaj promjene temperature kolone određen je analizom poredbenih otopina kod temperature kolone od 20 °C i 30 °C. Prema analitičkoj metodi temperatura kolone je 25 °C.

Tablica 22. Otpornost metode kod promjene temperature kolone na 20 °C

	<b>ST 1</b>	<b>ST 2</b>
<b>Injektiranje br.</b>	<b>površina</b>	<b>površina</b>
1	4445285	4448615
2	4446074	4436937
3	4445339	4434500
4	4445607	4435802
5	4447297	4438553
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>4445920</b>	<b>4438881</b>
<b>STD</b>	<b>830,5</b>	<b>5641,6</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,02</b>	<b>0,13</b>
<b>RF</b>	<b>4,50 x 10<sup>-7</sup></b>	<b>4,51 x 10<sup>-7</sup></b>

Tablica 23. Temperatura kolone 20 °C - podudaranje standarda

<b>RS</b>	<b>RF</b>
<b>1</b>	4,49896 x 10 <sup>-7</sup>
<b>2</b>	4,50519 x 10 <sup>-7</sup>
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>4,50207 x 10<sup>-7</sup></b>
<b>STD</b>	<b>4,40749 x 10<sup>-10</sup></b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,10</b>

Iz tablica 22 i 23 vidimo da su *RSD* za lidokain standard i *RSD* za *RF* vrijednost unutar dozvoljenih granica od  $\leq 1,5\%$ , odnosno  $\leq 1,0\%$ . Smanjenje temperature kolone za 5 °C nema utjecaja na metodu.

Tablica 24. Otpornost metode kod promjene temperature kolone na 30 °C

	<b>ST 1</b>	<b>ST 2</b>
<b>Injektiranje br.</b>	<b>površina</b>	<b>površina</b>
1	4456584	4439674
2	4451012	4443686
3	4455141	4444998
4	4452598	4441077
5	4455755	4446700
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>4454218</b>	<b>4443227</b>
<b>STD</b>	<b>2330,0</b>	<b>2857,2</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,05</b>	<b>0,06</b>
<b>RF</b>	<b>4,49 x 10<sup>-7</sup></b>	<b>4,50 x 10<sup>-7</sup></b>

Tablica 25. Temperatura kolone 30 °C - podudaranje standarda

<b>RS</b>	<b>RF</b>
<b>1</b>	4,49058 x 10 <sup>-7</sup>
<b>2</b>	4,50078 x 10 <sup>-7</sup>
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>4,49568 x 10<sup>-7</sup></b>
<b>STD</b>	<b>7,21806 x 10<sup>-10</sup></b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,16</b>

Iz tablica 24 i 25 vidimo da su *RSD* za lidokain standard i *RSD* za *RF* vrijednost unutar dozvoljenih granica od ≤1,5%, odnosno ≤1,0%. Povećanje temperature kolone za 5 °C nema utjecaja na metodu.

#### 4.8.4. Promjena pH pufera za ± 0,25 pH volumena

Utjecaj promjene pH pufera određen je analizom poredbenih otopina kod pH pufera 3,15 i 3,65. Prema analitičkoj metodi pH pufera je 3,4.

Tablica 26. Otpornost metode kod promjene pH pufera za +0,25 pH jedinica (pH 3,65)

	<b>ST 1</b>	<b>ST 2</b>
<b>Injektiranje br.</b>	<b>površina</b>	<b>površina</b>
1	4421426	4446248
2	4422642	4445660
3	4422378	4446556
4	4422361	4446312
5	4421802	4448477
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>4422122</b>	<b>4446651</b>
<b>STD</b>	<b>494,9</b>	<b>1072,7</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>
<b>RF</b>	<b>4,52 x 10<sup>-7</sup></b>	<b>4,50 x 10<sup>-7</sup></b>

Tablica 27. pH 3,65 - podudaranje standarda

<b>RS</b>	<b>RF</b>
<b>1</b>	4,52317 x 10 <sup>-7</sup>
<b>2</b>	4,49822 x 10 <sup>-7</sup>
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>4,51069 x 10<sup>-7</sup></b>
<b>STD</b>	<b>1,76429 x 10<sup>-9</sup></b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,39</b>

Iz tablica 26 i 27 vidimo da su *RSD* za lidokain standard i *RSD* za *RF* vrijednost unutar dozvoljenih granica od  $\leq 1,5\%$ , odnosno  $\leq 1,0\%$ . Povećanje pH pufera za 0,25 pH jedinica nema utjecaja na metodu.

Tablica 28. Otpornost metode kod promjene pH pufera za -0,25 pH jedinica (pH 3,15)

	<b>ST 1</b>	<b>ST 2</b>
<b>Injektiranje br.</b>	<b>površina</b>	<b>površina</b>
1	4418954	4448968
2	4419651	4448717
3	4426021	4447993
4	4425565	4448479
5	4420836	4449084
<b>Srednja vrijednost</b>	<b>4422205</b>	<b>4448648</b>
<b>STD</b>	<b>3347,3</b>	<b>434,4</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,08</b>	<b>0,01</b>
<b>RF</b>	<b><math>4,52 \times 10^{-7}</math></b>	<b><math>4,50 \times 10^{-7}</math></b>

Tablica 29. pH 3,15 - podudaranje standarda

<b>RS</b>	<b>RF</b>
<b>1</b>	$4,52308 \times 10^{-7}$
<b>2</b>	$4,49620 \times 10^{-7}$
<b>srednja vrijednost</b>	<b><math>4,50964 \times 10^{-7}</math></b>
<b>STD</b>	<b><math>1,90107 \times 10^{-9}</math></b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,42</b>

Iz tablica 28 i 29 vidimo da su *RSD* za lidokain standard i *RSD* za *RF* vrijednost unutar dozvoljenih granica od  $\leq 1,5\%$ , odnosno  $\leq 1,0\%$ . Smanjenje pH pufera za 0,25 pH jedinica nema utjecaja na metodu.

U ovom radu validirana je HPLC analitička metoda za određivanje sadržaja lidokaina u Lidokain spreju. Određeni su sljedeći parametri: selektivnost, preciznost mjerenja, ponovljivost, intermedijarna preciznost, linearnost, točnost, stabilnost mjernih otopina standarda i uzorka kod sobne temperature te otpornost metode.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti:

- Na kromatogramima diluenta i *placeba* te na kromatogramima tretiranih uzoraka nema interferirajućih pikova. Metoda je selektivna i specifična.

- *RSD* je 0,27% na 6 uzoraka, što zadovoljava kriterij  $\leq 2,0\%$ . Razlika srednjih vrijednosti dobivenih kod ispitivanja ponovljivosti i intermedijarne preciznosti je 0,8%. Zadovoljen je kriterij  $\Delta \leq \pm 2,0\%$ . Metoda je precizna.

- Metoda je linearna u zadanom opsegu od 40% do 140% propisane količine lidokaina, uz koeficijent regresije veći od 0,9990.

- Metoda je točna. Svi rezultati za povrat, odnosno stupanj iskoristivosti, su unutar granica od 98,0%-102,0%. *RSD* je 0,19% ( $\leq 2,0\%$ ).

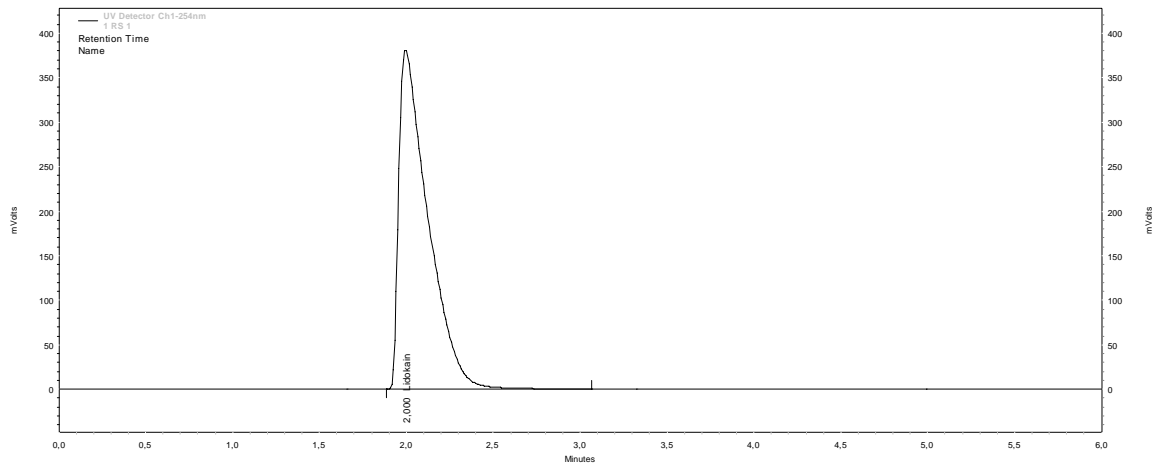
- Omjer *RF* vrijednosti standarda čuvanog u automatskom uzorkivaču na sobnoj temperaturi i svježe pripremljenog standarda je unutar granica od 98,0%-102,0% za 24 sata. Otopina standarda lidokaina stabilna je 24 sata na sobnoj temperaturi. Stabilnost uzoraka zadovoljava sve zadane kriterije, tj. razlika između vrijednosti sadržaja lidokaina dobivenog u određenim vremenskim intervalima u odnosu na inicijalnu vrijednost je unutar zadanih 2,0%. Uzorci su stabilni 48 sata na sobnoj temperaturi.

- Promjena protoka za  $\pm 0,2$  mL/min, promjena sastava acetonitrila u pokretnoj fazi za  $\pm 0,2$  volumena, promjena temperature kolone za  $\pm 5$  °C i promjena pH pufera za  $\pm 0,25$  pH jedinica nemaju utjecaja na metodu. Metoda je otporna na promjenu uvjeta.

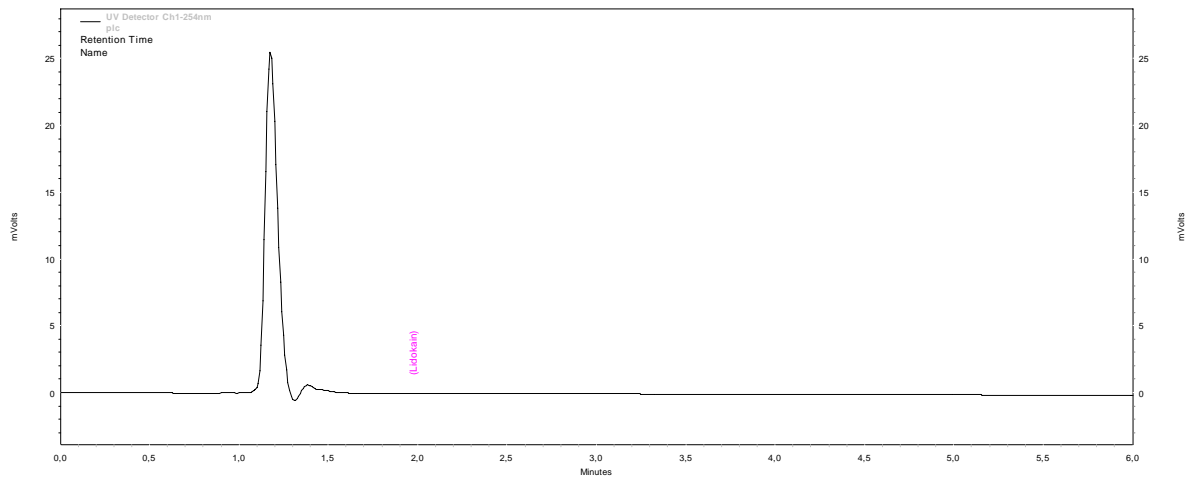
Dakle, na temelju provedene validacije može se zaključiti da HPLC metoda za određivanje sadržaja lidokaina u Lidokain spreju ispunjava sve postavljene kriterije validacije i kao takva može se koristiti u redovnoj kontroli gotovih proizvoda.

- [1] Opća enciklopedija jugoslavenskog leksikografskog zavoda, Zagreb 1977., broj 5, str. 121-122
- [2] <http://www.stomportal.com/hr/anestetici/lokalnaanesteziapodjelaimehanizmidjelovanja.html> (25052012)
- [3] <http://www.stomportal.com/hr/farmakologija/lidocainexylocaineotocainexylestesin.html> (25052012)
- [4] **Nesek B.**, Razvoj matematičkog modela procesa gel-filtracije u kromatografskoj koloni, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2004.
- [5] **Luterotti S.**, Uvod u kemijsku analizu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2009., str. 222-224
- [6] **Cerjan-Stefanović Š., Drevenkar V., Jurišić B., Medić-Šarić M., Petrović M., Šegudović N., Švob V., Turina S.**, Kromatografsko nazivlje, IUPAC preporuke 1993. i 1998., HINOS d.o.o., Zagreb, 1999., str. 29-60
- [7] **Kaštelan-Macan M.**, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, 2003. str. 57-78
- [8] **Pokrajac M.**, Farmakokinetika, Beograd, 2002.
- [9] Protokol o validaciji HPLC metode za određivanje sadržaja lidokaina u Lidokain spreju iz tvrtke Belupo d.d.
- [10] **Kovač I.**, Validacija HPLC metode za određivanje sadržaja betametazona u Belogent kremi, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2006.
- [11] **Podravec A.**, Validacija HPLC metode za određivanje sadržaja cefaleksina u Cefaleksin 500 mg kapsulama, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2003.
- [12] <http://www.shimadzu.com/an/hplc/LC2010/2010.html> (02072012)

**PRILOG 1.** Primjeri kromatograma iz validacije metode za određivanje sadržaja lidokaina

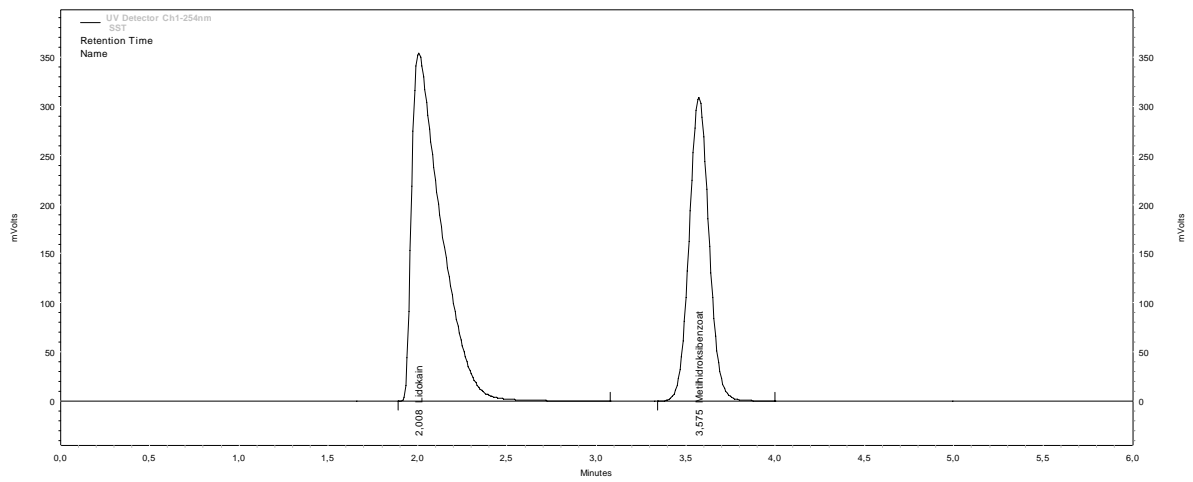


Slika 6. Kromatogram radnog standarda

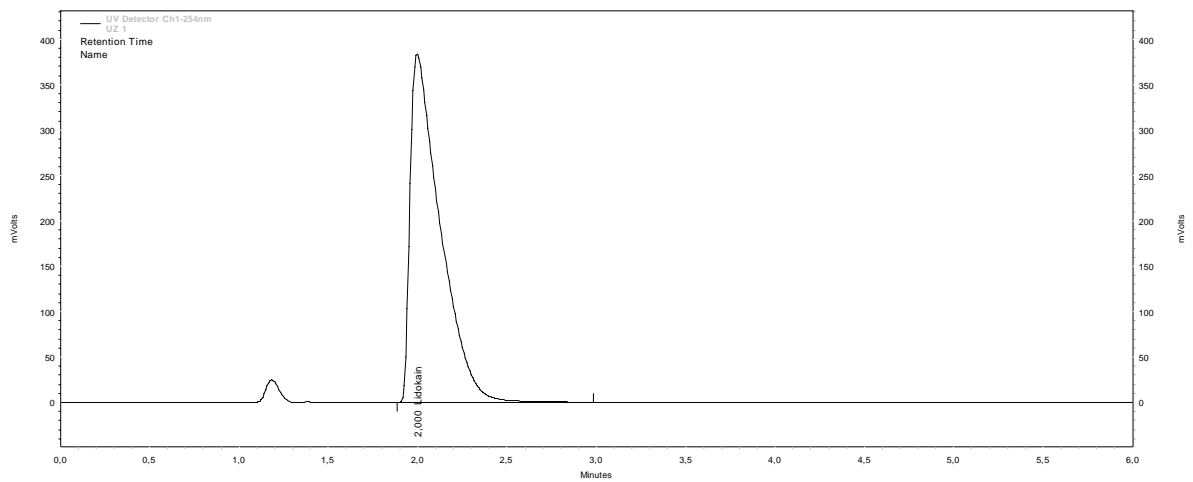


Slika 7. Kromatogram *placeba*

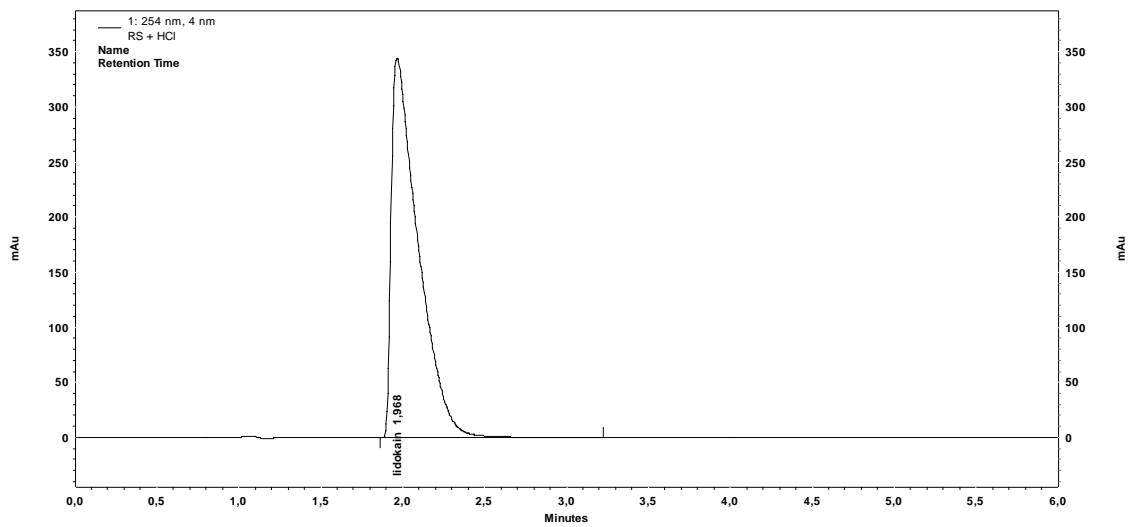




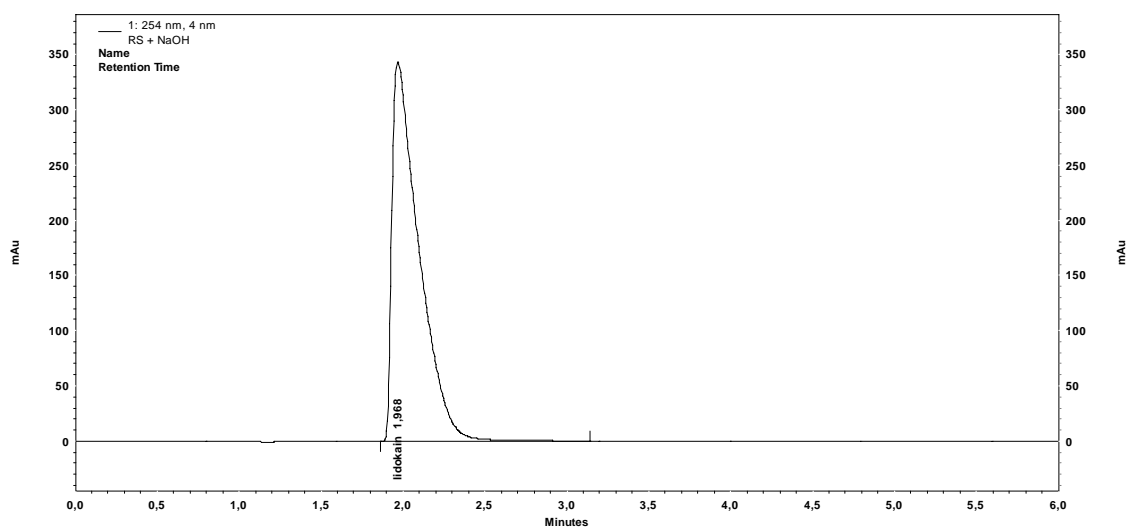
Slika 8. Kromatogram otopine za pogodnost sustava



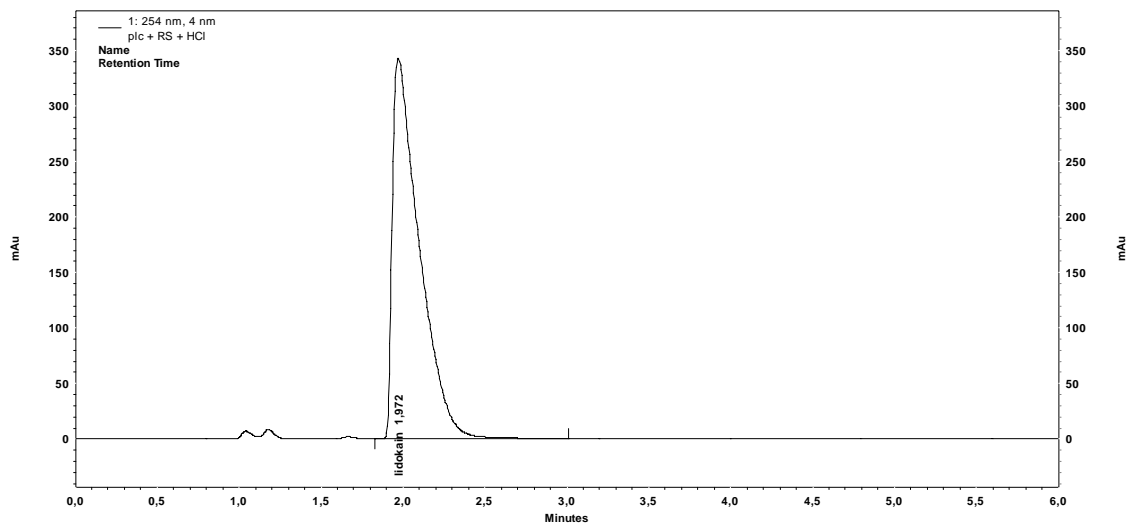
Slika 9. Kromatogram uzorka Lidokain spreja



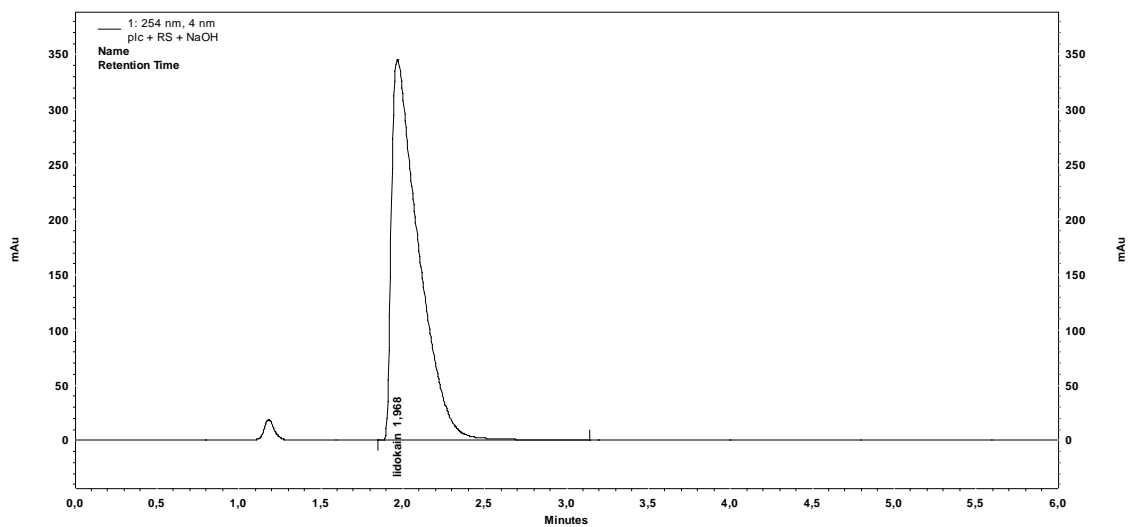
Slika 10. Kromatogram za selektivnost – ispitivanje lidokaina u kisolini



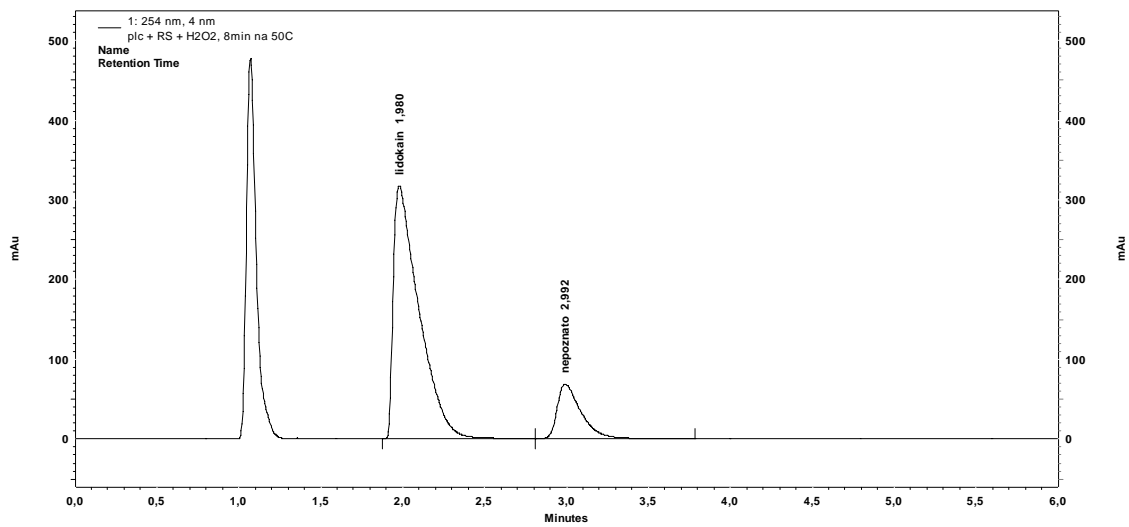
Slika 11. Kromatogram za selektivnost – ispitivanje lidokaina u lužini



Slika 12. Kromatogram za selektivnost – ispitivanje *placeba* i lidokaina u kislini



Slika 13. Kromatogram za selektivnost – ispitivanje *placeba* i lidokaina u lužini



Slika 14. Kromatogram za selektivnost – ispitivanje *placeba* i lidokaina u vodikovom peroksidu



Slika 15. Shimadzu LC-2010C<sub>HT</sub> HPLC sustav